

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E. A. P. FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**Estudio farmacognóstico y bromatológico de los
residuos industriales de la extracción del aceite de
Plukenetia volubilis L. (Sacha inchi)**

TESIS

para optar al título profesional de Químico Farmacéutica

AUTOR

Iris Giovana Mondragón Tarrillo

ASESORA

Arilmí Gorriti Gutiérrez

Lima-Perú

2009

DEDICATORIA

A Dios

*Por darme la oportunidad de estudiar Farmacia y Bioquímica,
iluminándome en los momentos en que todo parecía difícil y confuso,
sólo en fe y encomendándome a Él, lograron disipar y esclarecer mis
dudas*

A mis padres: Elías Mondragón Silva y Sara Tarrillo Linarez

*Por ser las personas que más he admirado toda mi vida, que con sus
acciones me han enseñado que el trabajo, la perseverancia, la
superación continua y la humildad son esenciales en la vida y para la
vida.*

A mis hermanos: Oscar Elías, Edgar Ronal e Ybett Rocío.

*Porque en toda mi etapa universitaria llena de esfuerzo, siempre me han
dado su apoyo, solidaridad y comprensión*

A mi Madrina: Orfelina Cotrina Mejía.

*Por ser como una segunda madre y ser ejemplo de orden, disciplina
esfuerzo y sacrificio.*

A Miguel Ángel Inocente.

*Por su amor, su amistad, su apoyo durante nuestra etapa universitaria
y por ser él una parte de mi felicidad*

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de Tesis: Dra. Arilmí Gorriti Gutiérrez, por creer en mi y permitir llevar a acabo ésta investigación, gracias sinceramente por su comprensión, por su tiempo y por cada una de las enseñanzas dadas las cuales me permitieron llegar hasta aquí.

A mi Co- Asesora, Mg. Teresa Arbaiza Fernández, por su paciencia, dedicación y comprensión en todo momento; por sus enseñanzas e instrucciones en la realización del estudio Bromatológico.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE BIOQUÍMICA Y NUTRICIÓN
DE LA UNMSM (CIBN)**

A la Mg. Ines Arnao Salas, mi eterno agradecimiento y gratitud en esta etapa tan importante de mi vida profesional, por toda la paciencia y el tiempo dedicado, por sus sugerencias, ideas, respaldo y consejos en el desarrollo de la determinación cualitativa y cuantitativa de aminoácidos y sobre todo por su gran amistad.

Al Dr. Mario Monteghirfo Gomero mi eterno agradecimiento y gratitud por ampliar mis conocimientos y permitir culminar con su apoyo incondicional una parte importante de mi tesis.

*Un agradecimiento muy especial y mi gratitud a los Docentes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, en especial a la : **Mg. Bertha Jurado Teixeira , Dra. Augusta Córdova, Dr. Cesar Fuertes; Mg. Moisés García; Mg. Mirtha Roque; Q. F. Marielena Salazar; Q. F. Vicky Ireys; Q. F. Gloria Gordillo; Q. F. Julio Ruiz;** por su apoyo y colaboración en el desarrollo de la tesis.*

*A todos los trabajadores del Instituto CIBN de la UNMSM por su apoyo, aportaciones y sugerencias en el desarrollo de la tesis, en especial a la: **Dra. Doris Huerta, Mg. Silvia Suárez; Mg. Raquel Oré; Mg. Patricia Woll, Q. F. Rubén Valdivieso, Biol. Juan Trabuco; Biol. Rosalía Callohuari.***

*A mi tutora del HNGAI, **Dra. Rosario Chipana Florez;** por su amistad, y comprensión en la realización y culminación de la tesis durante el año 2008.*

*A todos mis compañeros y amigos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM y del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, **Elizabeth Poma, Eveling Requis, Eveling Taipe ,Jazmín Alfaro, María Díaz, Deybbis Ayala, Linne Cáceres, Angi More, Erika Sinche , Henry Ostos, Dany Rueda** y especialmente a **Gina Grisson Salsavilca y Cristhin Zacarillas** por su amistad, enseñanzas y ayuda incondicional.*

Y a todos los demás no mencionados.... Dios los bendiga

MUCHAS GRACIAS

AGRADECIMIENTO ESPECIAL

Al Presidente y distinguidos Miembros del jurado por sus sugerencias y aportes de investigación realizado.

Presidenta

Dra. Eloisa Maximina Hernandez Fernandez

Miembros

Q.F. Luz Fabíola Guadalupe Sifuentes

MG. Margarita Eva Lovatón Erazo

MG. Eriberto Carrasco Raymunde

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	9
SUMMARY	10
ABREVIATURA	11
I.INTRODUCCIÓN	12
II.GENERALIDADES	14
2.1. Antecedentes	14
2.2. Estudio Farmacognóstico	16
2.2.1. Datos etnobotánicos y etnofarmacológicos	16
2.2.1.1. Datos etnobotánicos	16
2.2.1.2. Uso etnofarmacológico	16
2.2.2. Hábitat y recolección	17
2.2.3. Protocolo botánico	18
2.2.3.1. Ubicación taxonómica	18
2.2.3.2. Descripción morfológica	18
2.3. Estudio bromatológico	19
2.3.1. Valor nutritivo de	19
2.3.2. Digestibilidad	20
2.3.3. Calidad de proteínas	21
2.3.4. Análisis de aminoácidos	21
2.3.4.1. Cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa	23
2.3.4.2. Métodos de derivatización para la separación cromatográfica	24
2.3.4.3. Reactivos de derivatización de precolumna	25
2.3.4.3.1. Ortoftaladehído (OPA)	25
2.3.4.3.2. Fenilisotiocianato(PICT)	26
2.3.4.3.3. Fluorenilmetil cloroformato (FMOC-Cl)	27
2.3.4.3.4. Cloruro de dansilo	27
2.4. Fibra dietética	27
2.4.1. Interés de la fibra dietética	28
2.5. Potencial industrial	29
2.5.1. Mercado del sachu inchi	30
2.5.1.1. Comercio internacional	32
2.5.1.2. Comercio nacional	33
2.5.2. Residuos	34
2.5.2.1. Normatividad y gestión de residuos sólidos	36
2.5.2.2. Manejo de residuos sólidos	36
2.5.2.3. Los residuo de acuerdo a los métodos de extracción del aceite	37

	Página
2.5.2.4. Temperatura y calidad de los residuos de la extracción de aceite	38
2.6. Desarrollo sostenible	39
III. PARTE EXPERIMENTAL	40
3.1. Materiales, equipos y reactivos	40
3.2. Metodología	44
3.2.1. Obtención y preparación de la muestra	44
3.2.2. Estudio farmacognóstico	44
3.2.2.1. Análisis cualitativo	44
3.2.2.1.1. Análisis cromatográfico (CCF)	48
3.2.2.2. Determinación cuantitativa de taninos	49
3.2.2.3. Determinación cuantitativa de saponinas totales	51
3.2.3. Estudio Bromatológico	51
3.2.3.1. Estudio químico proximal	51
3.2.3.2. Determinación de minerales y oligoelementos	56
3.2.3.3. Determinación de vitaminas	57
3.2.3.4. Digestibilidad de proteínas <i>in vitro</i>	58
3.2.3.4.1. Método de pepsina y ácido clorhídrico	58
3.2.3.4.2. Método enzimático por celulasa	58
3.2.3.5. Determinación de aminoácidos por HPLC	58
3.2.4. Evaluación de la toxicidad aguda a dosis límite	63
IV. RESULTADOS	65
4.1. Estudio Farmacognóstico	65
4.1.1. Ensayo organoléptico	65
4.1.2. Análisis cualitativo	65
4.1.3. Análisis cuantitativo de taninos y saponinas totales	67
4.1.3.1. Determinación cuantitativa de taninos	67
4.1.3.2. Determinación cuantitativa de saponinas totales	70
4.1.4. Análisis cromatográfico	72
4.2. Estudio Bromatológico	75
4.2.1. Análisis químico proximal	75
4.2.2. Fibra detergente neutra	78
4.2.3. Minerales esenciales	79
4.2.4. Vitaminas	79
4.2.5. pH y acidez total	80
4.2.6. Digestibilidad de proteínas <i>in vitro</i>	83

4.2.6.1. Nitrógeno soluble en pepsina	83
4.2.6.2. Digestibilidad enzimática por celulasa	84
4.2.6.2.1. ANOVA de tiempo y porcentaje de digestibilidad	85
4.2.6.3. Determinación de aminoácidos	86
4.2.6.3.1. Prueba de solubilidad y determinación de proteínas	86
4.2.6.3.2. Extracción y purificación de proteínas	87
4.2.6.3.3. Valores obtenidos del pico I del fraccionamiento proteico.....	88
4.2.6.3.4. Composición de aminoácidos de los residuos de la extracción de aceite de sacha inchi	89
4.2.6.3.4.1. Análisis de los aminoácidos esenciales del sacha inchi	90
4.2.6.3.4.2. Puntaje químico	91
4.3. Evaluación de toxicidad aguda a dosis límite	93
V. DISCUSIÓN	98
VI. CONCLUSIONES	104
VII. RECOMENDACIONES	105
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106
IX. ANEXOS	112

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Composición química del sacha inchi	15
Tabla 2. Uso etnofarmacológico de <i>Plukenetia volubilis</i> L. sacha inchi	16
Tabla 3. Hábitat y recolección	17
Tabla 4. Digestibilidad en diferentes mezclas nutritivas	20
Tabla 5. Puntaje químico de algunos alimentos	21
Tabla 6. Las proteínas y aminoácidos de la semilla de sacha inchi versus otras semillas	22
Tabla 7. Reactivos de derivatización	25
Tabla 8. Beneficio de la fibra soluble e insoluble en la salud	28
Tabla 9. Clasificación de la fibra según su grado de fermentabilidad	29
Tabla 10. Exportaciones de productos naturales en dólares americano	33
Tabla 11. Composición de los residuos sólidos municipales	36
Tabla 12. Composición de los principios inmediatos del análisis de Weende	55
Tabla 13. Condiciones de la separación de los PICT	60
Tabla 14. Ensayo organoléptico	65
Tabla 15. Rendimiento y determinación de sustancias solubles	65
Tabla 16. Resultado de la marcha fitoquímica del extracto etéreo	65
Tabla 17. Resultado de la marcha fitoquímica del extracto alcohólico	66
Tabla 18. Resultado de la marcha fitoquímica del extracto acuoso	66
Tabla 19. Resultados de la determinación de carbohidratos	67
Tabla 20. Curva de calibración de ácido tánico $f(x/y)$	67
Tabla 21. Estadística de la regresión del ácido tánico	67
Tabla 22. Análisis de varianza del ácido tánico	67
Tabla 23. Porcentaje de ácido tánico de residuos de la extracción de aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L.	69
Tabla 24. Curva de calibración de saponina estándar y estadística descriptiva de $f(x/y)$	70
Tabla 25. Estadística de regresión de la saponina estándar	71
Tabla 26. Análisis de varianza de la saponina estándar	71
Tabla 27. Porcentaje de saponinas totales de residuos de la extracción del aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L.	72
Tabla 28. Determinación de humedad	75
Tabla 29. Determinación de proteínas	75
Tabla 30. Determinación de proteínas en muestra desengrasada	76
Tabla 31. Determinación de extracto etéreo	76
Tabla 32. Determinación de fibra cruda	76
Tabla 33. Determinación de cenizas	77

	Página
Tabla 34. Análisis proximal de los residuos industriales de la extracción del aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L.	77
Tabla 35. Determinación de la pared celular y contenido celular.....	78
Tabla 36. Determinación de FDN.....	78
Tabla 37. Resultados de la determinación de FDN	78
Tabla 38. Determinación de calcio, fósforo, hierro	79
Tabla 39. Determinación de tiamina, riboflavina y niacina	79
Tabla 40. Resultados de la determinación de minerales y vitaminas	79
Tabla 41. Resultados de la determinación de pH	80
Tabla 42. Resultados de la determinación de acidez total	80
Tabla 43. Tabla comparativa del análisis proximal y pared celular de residuos obtenidos de la extracción del aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L., <i>Glycine max</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> W.	81
Tabla 44. Tabla comparativa de minerales, vitaminas (tiamina) de residuos obtenidos de la extracción del aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L., <i>Glycine max</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> W.	82
Tabla 45. Resultados de la digestibilidad de proteínas <i>in vitro</i> por el método enzimático pepsina de los residuos de la extracción del aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L.	83
Tabla 46. Resultados de la digestibilidad enzimática <i>in vitro</i> por el método enzimático de celulasa.....	84
Tabla 47. Resumen de ANOVA de la influencia del tiempo en el %DMS por celulasa	85
Tabla 48. Resultado de ANOVA del %DMS en función del tiempo	85
Tabla 49. Resultados de la prueba de solubilidad y determinación de proteínas de los residuos industriales de la extracción del aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L., para la utilización del solvente adecuado para la extracción de la fracción proteica.....	86
Tabla 50. Condiciones de la fracción proteica, del mayor pico obtenido del residuo de la extracción del aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”	88
Tabla 51. Aminograma de los residuos industriales de la extracción del aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L. sachá inchi (mg/g) en comparación con <i>A.caudatus</i> , <i>Glycine max</i> L., <i>Chenopodium quinoa</i> .W.	89
Tabla 52. Comparación de la composición de los aminoácidos esenciales de los residuos de la extracción del aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L. sachá inchi(mg/g) con <i>Chenopodium quinoa</i> .W, <i>Chenopodium pallidicaule</i> , <i>Oxalis tuberosa</i> , <i>Tropaeolum tuberosum</i> , <i>Arachis hipogea</i> L., <i>Helianthus annuus</i> L y la FAO/OMS	90

	Página
Tabla 53. Puntaje químico	91
Tabla 54. Resultados del ensayo de toxicidad aguda oral a dosis límite	93
Tabla 55. Resultados del comportamiento de la media \pm desviación estándar en la evaluación de toxicidad aguda a los 0, 7 y 14 días.....	93
Tabla 56. Rango de la masa corporal con relación a la edad en semanas de la especie y línea del modelo biológico.	93
Tabla 57. Resumen ANOVA para el grupo control y tratado para ambos sexos	95
Tabla 58. Análisis de varianza para determinar la diferencia entre grupos	95
Tabla 59. Prueba F para varianza de dos muestras para la determinación del comportamiento del peso corporal para el grupo control y tratado hembra.	96
Tabla 60. Prueba T para dos muestras suponiendo varianzas iguales para la determinación del comportamiento del peso corporal para el grupo control y tratado hembra.	96
Tabla 61. Prueba F para varianza de dos muestras para la determinación del comportamiento del peso corporal para el grupo control y tratado macho.	97
Tabla 62. Prueba T para dos muestras suponiendo varianzas iguales para la determinación del comportamiento del peso corporal para el grupo control y tratado macho	97

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Plantaciones de sacha inchi, fruto y semilla	19
Figura 2. Reacción de los aminoácidos con OPA.MCE=Mercaptoetanol.....	26
Figura 3. Reacción de derivatización de los aminoácidos con PICT	26
Figura 4. Reacción de derivatización de aminoácidos con FMOC-Cl.....	27
Figura 5. Proceso de extracción del aceite y residuos de <i>Plukenetia volubilis</i> L.....	31
Figura 6. Exportaciones de productos naturales	32
Figura 7. Evolución de las exportaciones de “sacha inchi” y derivados	34
Figura 8. Estimación de residuos basada en la población total del país	34
Figura 9. Disposición final de los residuos sólidos	35
Figura 10. Composición de los residuos sólidos	35
Figura 11. Diagrama de flujo del estudio realizado a los residuos de la extracción del aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”	45
Figura 12. Extracción sucesiva al residuo de la extracción de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi” para la marcha fitoquímica	46
Figura 12. Marcha fitoquímica del extracto etéreo	47
Figura 13. Marcha fitoquímica del extracto alcohólico	47
Figura 14. Marcha fitoquímica del extracto acuoso	48
Figura 15. Procedimiento de extracción, identificación y cuantificación de saponinas totales	52
Figura 16. Determinación de fibra cruda	53
Figura 17. Determinación de fibra detergente neutro	54
Figura 18. Procedimiento de extracción de proteínas solubles de residuos industriales de la extracción del aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L. sacha inchi.....	61
Figura 19. Procedimiento de hidrólisis de la proteína soluble y derivatización de los aminoácidos de residuos industriales de la extracción de aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L. sacha inchi.....	62
Figura 20. Proceso de separación de los feniltiocarbamilaminoácidos de residuos industriales de la extracción del aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L. sacha inchi.....	63
Figura 21. Recta de regresión del ácido tánico	69
Figura 22. Recta de regresión de la saponina estándar.	71
Figura 23. Comparación del análisis proximal y pared celular de residuos obtenidos de la extracción del aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”, <i>Glycine max</i> L. “soya”; <i>Chenopodium quinoa</i> W. “quinoa”	81
Figura 24. Comparación de minerales, calcio, fósforo y hierro de residuos obtenidos de la extracción del aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”, <i>Glycine max</i> L. “soya”; <i>Chenopodium quinoa</i> W. “quinoa”	82

Figura 25. Comparación en $\mu\text{g/g}$ % de tiamina de residuos obtenidos de la extracción del aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”, <i>Glycine max</i> L. “soya”; <i>Chenopodium quinoa</i> w. “quinoa”	83
Figura 26. Curva de la absorbancia de la fracción proteica de la muestra del residuo al 20% en Tris-HCl 0.05M 6.5pH a una lectura de 280nm y 30 mL/h de velocidad de elución	87
Figura 27. Curva de la absorbancia de la fracción proteica de la muestra del residuo al 30% en Tris-HCl 0.05m 6.5ph a una lectura de 280nm y 30 mL /h de velocidad de elución.....	87
Figura 28. Composición de la solución estándar de aminoácidos stock N°AA-S-18 (Sigma –Aldrich) a una concentración de $2.5 \mu\text{moles} \cdot \text{mL}^{-1}$, en una dilución de 20 uL en 300uL de buffer acetato de amonio 0.05M, pH 6	91
Figura 29. Composición de aminoácidos de los residuos industriales de la extracción del aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L.sacha inchi. (30%) en una dilución de 3.7mg de proteína soluble en 500uL de buffer acetato de amonio 0.05M,pH 6	92
Figura 30. Composición de aminoácidos de los residuos industriales de la extracción del aceite de <i>Plukenetia volubilis</i> L.sacha inchi. (20%) en una dilución de 3.4 mg de proteína soluble en 500uL de buffer acetato de amonio 0.05M,pH 6	92
Figura 31. Ganancia de peso en el ensayo de toxicidad aguda a dosis única oral en el grupo control y tratamiento de hembras a los 7 y 14 días de ensayo	94
Figura 32. Comportamiento del peso corporal para el grupo control y tratado hembra.....	96
Figura 33. Comportamiento del peso corporal para el grupo control y tratado macho	97

ABREVIATURAS

FONAM	: Fondo Nacional del Ambiente.
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography.
UV	: Ultravioleta.
FAO	: Food and Agriculture Organization.
WHO	: World Health Organization.
CFR	: Cromatografía en fase reversa.
OPA	: Ortoftaladehído.
PICT	: Fenilisotiocianato.
FMOC-Cl	: Fluorenilmetil cloroformato.
CERPER	: Certificaciones del Perú.
SAT	: Sociedad de Asesoramiento Técnico.
Tris-HCl	: 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, hydrochloride; Tris HCl; Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride.
Vo	: Volumen muerto.
AA-STD-18	: 18 aminoácidos estándar.
pp	: Precipitado.
ANOVA	: Análisis de varianza.
R	: Coeficiente de correlación.
R²	: Coeficiente de determinación.
ppm	: Partes por millón.
\bar{X}	: Media.
S	: Desviación estándar
F	: Distribución F de Fisher-Snedecor.
FDN	: Fibra detergente neutra.
DMS	: Digestibilidad de materia seca.
FMN	: Flavina mononucleótido
FAD	: Flavina adenina dinucleótido

RESUMEN

La producción de biomasa residual, como consecuencia de las actividades humanas constituye fuente de energía y materiales desaprovechados con grave peligro para la biosfera y daño a sus recursos naturales. Dentro de la composición de residuos sólidos, se encuentran en mayor proporción los de materia orgánica y dentro de estos se encuentran los residuos producidos por la industria aceitera y de granos oleosos que se incrementa en estos últimos años. El presente trabajo de investigación realizó un estudio, farmacognóstico, bromatológico y toxicológico de los residuos industriales de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L. para su aprovechamiento total y contribuir al desarrollo sostenible del país. En los resultados del estudio farmacognóstico se ha encontrado: esteroides, taninos y saponósidos. Los valores promedios obtenidos de taninos y saponinas totales en g% de muestra fueron: $1,3 \times 10^{-5}$ y $0,42 \pm 0,01$ respectivamente. En el estudio bromatológico: humedad, proteínas totales, extracto etéreo, fibra bruta, cenizas, extracto libre de nitrógeno (g%): $5,09 \pm 0,06$; $34,26 \pm 0,01$; $37,33 \pm 2,87$; $3,16 \pm 1,08$ y $3,24 \pm 0,33$ respectivamente. Fibra detergente neutro 16,33. Calcio, fósforo, hierro y tiamina en mg/100g: 317,83; 560,00; 4,19 y 0,31 respectivamente. La digestibilidad de proteínas *in vitro* por nitrógeno soluble en pepsina y celulasa fue de (g%) : $86,89 \pm 0,33$ y $90,71 \pm 1,73$. y aminoácidos esenciales mg/g: histidina 9,00; isoleucina 180,00; leucina 69,00; lisina 39,00; metionina 13,00; fenilalanina+tirosina 31,00; treonina 68,00 y valina 31,00. El estudio del ensayo toxicológico a dosis limite demostró la inocuidad de los residuos a dosis de 2000 mg/kg

Palabras claves: *Plukenetia volubilis* L., residuo, taninos, saponinas, análisis proximal, digestibilidad *in vitro* aminoácidos, HPLC.

SUMMARY

The production of residual biomass as a result of human activities, in addition to being a source of energy and materials almost entirely untapped, it presents a great danger to the biosphere where uncontrolled discharge or abandonment damages or destroys natural resources. Within the composition of solid waste, is in the highest proportion of organic matter and within these are the wastes produced by the oil industry and oil seeds. The industrial production of oil sacha inchi this increase in recent years, therefore, the production of waste is increasing. This research conducts a survey pharmacognostic, dieticians, and toxicology of industrial waste from the extraction of oil sacha inchi to be harvested at 100% and thus contribute to sustainable development of the country. In the study results pharmacognostic were found as secondary metabolites: steroids, tannins and saponins heterosides. The average values derived from tannins and saponins in g% of total sample were: 1.3×10^{-5} and 0.42 ± 0.01 respectively. The study bromatological: Moisture, total protein, ether extract, crude fiber, ash, nitrogen free extract (g %): 5.09 ± 0.06 ; 34.26 ± 0.01 ; 37.33 ± 2.87 ; 3.16 ± 1.08 and 3.24 ± 0.33 respectively. Neutral detergent fiber, 16.33. Calcium, phosphorus, iron, thiamine mg/100g: 317, 83; 560, 00; 4, 19 and 0, 31 respectively. *In vitro* protein digestibility of nitrogen soluble in pepsin and cellulase (g%): 86.89 ± 0.33 and 90.71 ± 1.73 Essential amino acids mg / g: histidine 9,00; isoleucine 180,00 ; leucine 69,00; lysine 39,00; methionine 13,00; phenylalanine + tyrosine 31,00; threonine 68,00 and valine 31,00. The results demonstrated the toxicological safety of the aqueous extract fixed dose of 2000 mg / kg.

Keywords: *Plukenetia volubilis* L., residue, tannins, saponins, proximate analysis, *in vitro* digestibility, amino acids, HPLC.

I. INTRODUCCIÓN

La gran producción de residuos que supone la normal actividad del hombre sobre nuestro planeta es uno de los principales problemas de hoy; ya que, provocan una progresiva degradación del medio ambiente.

Las industrias de productos alimenticios y bebidas no son tan contaminantes como otros sectores; sin embargo, son responsables de contaminar el medio ambiente al descargar efluentes líquidos con grandes cantidades de sedimento y residuos sólidos, por ejemplo, las industrias elaboradoras de aceite comestible que eliminan fibras, cáscaras y residuos resultantes de la extracción de aceite y grasa.

De acuerdo con el ADEX, PROMPEX y Biocomercio Perú, el aceite de sacha inchi y derivados han presentado una tendencia exportadora, relacionándose directamente a la producción de residuos. *Plukenetia volubilis* L., “sacha inchi”, es una Euphorbiaceae que comúnmente se conoce como maní del monte, sacha maní o maní del inca. Se encuentra distribuida desde América Central y en el Perú se le encuentra en estado silvestre en diversos lugares de San Martín, Ucayali, Huánuco, Amazonas, Madre de Dios y Loreto. Crece desde los 100 hasta los 2 000 m.s.n.m. Fue cultivado también en la costa peruana en la época prehispánica y se han encontrado semillas y representaciones en cerámicas (Brack, 1 999).

La primera mención científica de *Plukenetia volubilis* L., fue hecha en 1980 a consecuencia de los análisis de contenido graso y proteico realizados por la Universidad de Cornell en USA, que demostraron que las semillas de *Plukenetia volubilis* L., poseen 33% de proteínas y de 49% , lo que conllevó a un programa de investigaciones de las bondades del aceite como se describe y en la literatura; así como, estudios químicos, bromatológicos y ensayos clínicos en marcha.

Pascual, G., et al encontraron ácidos grasos del aceite crudo de *Plukenetia volubilis* L., destacando el ácido linolénico (43,75 %) y el ácido linoleico (36,99 %) y ácidos grasos saturados como el ácido palmítico (5,61 %). Gorriti, A., et al demostraron la actividad hipolipemiente del aceite de *Plukenetia volubilis* L., y no presentar toxicidad a dosis límite; también se ha realizado el estudio clínico Fase I de un alimento funcional a base de aceite de *Plukenetia volubilis* L., encontraron que el consumo a dosis diarias de 400 mg, 600 mg durante 30 días, en voluntarios sanos, no ocasionaron efectos adversos, ni alteración de signos vitales, revelando seguridad y tolerancia.

De acuerdo a lo anteriormente referido las investigaciones realizadas, muestran una mayor atención a las propiedades del aceite; sin embargo, se ha dejado de lado los residuos de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L.

En nuestro país, en el año 2000, el Congreso de la Republica promulgó en El Peruano la Ley General de Residuos Sólidos, Ley N° 27314, para gestionar y manejar los residuos sólidos en el Perú, que generan rentabilidad económica con derivados que puedan ser insertados en las cadenas de producción y mercados ya existentes.

La producción de aceite de sacha inchi genera residuos, que aún no han sido estudiados. Por tal motivo, se ha realizado: “El estudio Farmacognóstico y Bromatológico de los residuos industriales de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi)”.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo general:

Aprovechar los residuos industriales de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi), mediante el conocimiento integral de esta especie nativa, fomentando el desarrollo económico y social sostenible.

Sus objetivos específicos son:

1. Realizar el estudio farmacognóstico de los residuos industriales de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi).
2. Realizar el estudio bromatológico de los residuos industriales de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi).
3. Determinar el valor nutritivo a través de la digestibilidad *in vitro* y la determinación de aminoácidos esenciales de los residuos industriales de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi).
4. Evaluar la toxicidad aguda oral a dosis limites del extracto acuoso de los residuos industriales de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi).

La presente investigación se ha realizado gracias al apoyo de la Cátedra de Farmacognósia, Laboratorio de Bioquímica y Nutrición Animal del Centro de Producción de la Facultad de Medicina de Veterinaria de la UNMSM y el Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina Humana de la UNMSM.

II. GENERALIDADES

2.1. ANTECEDENTES

En la década de los ochenta, el gobierno peruano realizó diferentes estudios con el objetivo de buscar un producto agrario alternativo de gran productividad, que pudiera sustituir las plantaciones de hoja de coca, para apoyar a la lucha contra la pobreza.⁽¹⁾ Entre estos estudios apareció la investigación de *Plukenetia volubilis* L., hasta la fecha hay un sin número de investigaciones sobre esta planta, a continuación se presentan las más relevantes:

Huamán, J., et al⁽²⁾ determinaron que la ingesta de 50g de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi) que contenía 11g de omega 3 e ingerido como maní disminuyó la trigliceridemia posprandial en adultos jóvenes.

Pascual, G., et al⁽³⁾ encontraron ácidos grasos del aceite crudo de sacha inchi, destacando el ácido linolénico (43,75 %) y el ácido linoleico (36,99 %) y ácidos grasos saturados como el ácido palmítico (5,61 %).

Gorriti, A., et al⁽⁴⁾ encontraron ácidos esenciales poliinsaturados (82,21 %), monoinsaturados (9,62 %) y saturados (7,62%) en el aceite de sacha inchi, destacando: ácido linolénico (48,54 %) y el ácido linoleico (36,67 %). Asimismo ha demostrado la actividad hipolipemiente del aceite de sacha inchi, la cual no produce toxicidad a dosis límite.

Gorriti, A., et al⁽⁵⁾ realizaron el estudio clínico Fase I de un alimento funcional a base de aceite de sacha inchi, encontrando que la aplicación a dosis diarias de 400 mg, 600 mg durante 30 días, en voluntarios sanos, no ocasionó efectos adversos, ni alteración de signos vitales.

En el año 2001, a través del convenio INIA – Agroindustria Amazónica, analizó muestras de semilla del germoplasma de la estación experimental “El Porvenir” en los laboratorios del Instituto Tecnológico Pesquero del Perú, se encontró 44,24% y 54,21% de contenido de aceite⁽⁶⁾.

Benavides, J.; Morales, J.; y Chagman, J.; presentaron los resultados de su investigación en un documento titulado: “Avances en la caracterización del aceite y proteínas del cultivo *Plukenetia volubilis* L. como alternativa para la alimentación humana y animal (Yurimaguas – Perú; Instituto Nacional de Investigación Agraria. 1994. 17 h.). Los ecotipos Lamas y Shanao, procedentes de Tarapoto, se seleccionó para este estudio. Los resultados mostraron que el ecotipo Lamas destacó en contenido de aceite 41,7 %, superando en 1,2 % al ecotipo de Shanao, también Lamas destacó en contenido de proteínas. La calidad del aceite está dada por el alto contenido de ácidos grasos insaturados; Lamas y Shanao arrojaron 91,33 y 88,81%⁽⁷⁾.

En el año de 1995, Vela, L., desarrolló la tesis de grado “Ensayos para la extracción y caracterización del aceite de sacha inchi en el departamento de San Martín.”⁽⁸⁾

El Instituto Nacional de Producción, a través de estudios realizados por Gómez I., Reyna, J., Obregón, A., y Vela, L., determinaron que esta oleaginosa silvestre, contiene 48% de grasa, este equipo determinó también la calidad de la proteína de *Plukenetia volubilis* L., utilizando polvo atomizado y harina desengrasada por prensado.⁽⁸⁾

El Instituto de Ciencias de los Alimentos de la Universidad de CORNELL, encontró en *Plukenetia volubilis* L., un elevado contenido de aceite (49%), un contenido relativamente alto de proteínas (33%) y alto grado de digestibilidad⁽⁹⁾.

Tabla 1. Composición de la torta desengrasada de *Plukenetia volubilis* L.

COMPONENTE	BASE HÚMEDA (%)	BASE SECA (%)
Humedad	0.695	0.0
Proteína total	58.7197	59.1307
Grasa cruda	6.8823	6.9305
Fibra cruda	17.1826	17.3029
Ceniza	8.6599	8.7205
Carbohidratos	7.8605	7.9155
Total	100.00	100.00

Fuente: Extracción y caracterización de *Plukenetia volubilis* L. Pascual G. 1992

2.1. ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO

2.1.1. DATOS ETNOBOTÁNICOS Y ETNOFARMACOLÓGICOS

2.1.1.1. Datos etnobotánicos

La familia Euphorbiaceae comprende plantas anuales, de importancia ornamental, medicinal, alimentaria e industrial, que se caracterizan por la presencia de una sustancia lechosa, tipo látex y frutos tricapsulares. Abarca alrededor de 1280 géneros con 8000 especies aproximadamente, y se observa que está distribuido en todo el orbe ⁽¹⁰⁾.

Plukenetia volubilis L., es una planta nativa de la Amazonía Peruana descrita por primera vez, como especie, en el año 1753 por el Naturalista Linneo; de ahí su nombre científico. Crece desde los 100 msnm hasta 1500 msnm. Es un arbusto trepador o rastrero comúnmente se le encuentra en bordes de bosques secundarios (purmas), en cañaverales, sobre cercos vivos y como maleza en platanales y cultivos permanentes ⁽¹²⁾. Se cultivó en la costa peruana desde la época prehispánica y se han encontrado semillas y representaciones de su fruto en cerámicas de las culturas Chimú y Mochica. Actualmente se estudia la presencia de esta planta en la milenaria cultura Caral, al norte de Lima-Perú, con más de 3000 años de antigüedad ⁽¹³⁾.

2.1.1.2. Uso etnofarmacológico

En las áreas rurales de San Martín los pobladores utilizan la almendra de *Plukenetia volubilis* L., en su alimentación, ya sea cocida o tostada en la preparación de diversos platos como inchicapi, ají de sachá inchi, cutacho, mantequilla de sachá inchi, inchi cucho, tamal de sachá inchi, turrón de sachá inchi, ingesta de hojas crudas o cocidas por los pobladores nativos de la Amazonía, particularmente los huitotos, por considerar sus semillas muy nutritivas ⁽¹⁰⁻¹²⁾.

Las ancianas mayurunas, chayuhuitas, campas, huitotas, shipibas, yaguas y boras (pueblos indígenas de la amazonía peruana) mezclan el aceite de *Plukenetia volubilis* L. con harina de esta misma almendra y preparan una crema especial para revitalizar y rejuvenecer la piel” (Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello, 1992) ⁽¹⁴⁾.

Tabla 2. Uso etnofarmacológico de *Plukenetia volubilis* L.

Nombres vulgares , sacha inchi, sacha inchic, sacha maní, maní del inca, maní del monte, inca pennut					
Profesional ✓		Familiar ✓		Hierbero ✓	
Raíz	Tallo	Hojas ✓	Flores	Semilla ✓	Planta entera
Recomendaciones de uso, el sabor ligeramente amargo ("patco") de la almendra cruda desaparece durante el cocido, el tostado.					
Otras Disminuye el colesterol malo				Cuidados ninguno	
Origen biológico <i>Plukenetia volubilis</i> L.				Familia Euphorbiaceae	
Familia	Nombre científico	Nombre Vulgar	Dolencias		Estrategia De Obtención
Euphorbiaceae	<i>Plukenetia volubilis</i> L.	sacha inchi	Hipercolesterolemia		Recolección
					Campos

2.1.2. HÁBITAT Y RECOLECCIÓN

El género *Plukenetia* ha sido reportado en Malasia, Nueva Guinea, Borneo, México, etc. (Biblioteca Conmemorativa Orton, 1987). El número de especies reportadas en América Tropical varía de 7 a 12 (Stanley y Steyemark, 1949; Hutchinson, 1969). En América del Sur, la presencia de *Plukenetia volubilis* L., ha sido registrada en Bolivia y en la Amazonía Peruana en los departamentos de Madre de Dios, Huánuco, Oxapampa y San Martín ⁽¹⁵⁾.

Tabla 3. Hábitat y recolección de *Plukenetia volubilis* L.

Suelo	Amplia adaptación a diferentes tipos de suelo; crece en suelos ácidos (pH por debajo de 5.5) y con alta concentración de aluminio. Franco arcillosos y arenosos (pH 5.5 a 6.5)
Clima	Húmedo
Temperatura	Mínimo 10 °C, máximo 36°C.
Altitud	Crece desde los 100 msnm en la Selva Baja y 2 000 msnm en la Selva Alta.
Hábitat	Bosque tropical
Edad	Entre los 6.5 y 8.0 meses después del trasplante, cuando los frutos están secos, recogiendo las cápsulas manualmente cada 15 – 30 días.
Estación	Invierno

2.1.3. PROTOCOLO BOTÁNICO

2.1.3.1. Ubicación taxonómica

La clasificación botánica de la planta es la siguiente.^(12,16)

Reino	:	Vegetal
División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Orden	:	Euphorbiales
Familia	:	Euphorbiaceae
Género	:	Plukenetia
Especie	:	<i>Plukenetia volubilis</i> Linneo.
Ecotipo	:	Pinto Recodo

La especie *Plukenetia volubilis* L., es conocida de acuerdo al idioma o lugar con los siguientes nombres: Sacha inchi, mani estrella, mani inca, mani de monte, mani de bejuco, cacahuete inca, N'gart, Inca peanut, supua, amui-o, sachá yuchi, sachá yuchiqui, sampannankii, suwaa. Debido a la alta variabilidad genética se tienen los siguientes ecotipos: Pinto Recodo, Tambo Yaguas, Muyuy, Cumbaza, Lamas, Shanao y Río Putumayo⁽¹⁰⁾.

2.1.3.2. Descripción morfológica

Es una planta trepadora, voluble, semileñosa, de altura indeterminada de hojas alternas, de color verde oscuro, oval - elípticas, aseruladas y pinnatinervias, de 09 – 16 cm de largo y 06 – 10 cm. ancho. El ápice es puntiagudo y la base es plana o semi-arriñonada; las flores presenta un alto porcentaje de polinización cruzada, lo que implica es una especie alógama. En el sachá inchi se observan 2 tipos de flores: las masculinas son pequeñas, blanquecinas, dispuestas en racimos y las femeninas se encuentran en la base del racimo y ubicadas lateralmente de una a dos flores; el fruto es una cápsula, de 3,5 a 4,5 cm. de diámetro, con 4 lóbulos aristados (tetralobados) dentro de los cuales se encuentran 4 semillas y las semilla son ovaladas marrón oscuro, ligeramente abultadas en el centro y aplastadas hacia el borde. Según los ecotipos, el diámetro fluctúa entre 1,3 y 2,1 cm. y de 48 a 100 g de peso. En condiciones de medio ambiente y al aire libre, la semilla se conserva por más de un año⁽¹⁵⁾.



Figura 1. A la izquierda, plantaciones de sacha inchi en la amazonía peruana. A la derecha, fruto y semilla de *Plukenetia volubilis* L.

2.2. ESTUDIO BROMATOLÓGICO

2.2.1. VALOR NUTRITIVO

El valor nutritivo de los alimentos está determinado por la biodisponibilidad de nutrientes y la dinámica de los procesos de solubilización e hidrólisis en el tracto gastro-intestinal.

La utilización neta de la proteína, de leguminosa, en monogástricos está en torno al 65 – 70% en animales en crecimiento, mientras que los valores observados con proteínas de origen animal suelen superar el 90%. Esto se debe principalmente a tres causas: el perfil de aminoácidos de la proteína del grano leguminoso, su digestibilidad, y la presencia de sustancias no nutritivas ⁽¹⁷⁾.

Para valorar el empleo de leguminosas grano en la alimentación de rumiantes, es necesario conocer las características de estas semillas como fuente de proteína, su degradabilidad y digestibilidad, así como su efecto sobre la producción y composición de la leche.

2.2.1.1. Digestibilidad

La composición química de un alimento es solamente un indicativo del contenido de nutrientes, pero no de su biodisponibilidad; entonces, si una fuente de proteína ha sido procesada inadecuadamente, no puede ser bien digerida por el animal y contribuirá muy poco a su crecimiento y a la producción.

La digestibilidad se define como el porcentaje de un nutriente que desaparece a su paso por el tracto gastrointestinal. Es la proporción de alimento ingerido que no aparece en las heces. Se expresa en porcentaje (%).

A medida que aumenta el contenido de pared celular y principalmente el de lignina, disminuye el % de proteína bruta del forraje. A medida que aumenta la madurez, disminuye su contenido de proteínas y de azúcares solubles, y se eleva el contenido de fibra (principalmente celulosa y lignina).⁽¹⁸⁾

Los métodos para medir la digestibilidad de los nutrientes, implica el empleo de animales, pero resultan costosos en cuanto a tiempo, mano de obra calificada y número de análisis químicos. Generalmente se utilizan métodos químicos para la determinación de digestibilidad.

Los métodos químicos consisten en exponer los alimentos a la acción de enzimas digestivas como la pepsina, la celulasa y líquido rumial, incubándose las muestras durante cierto periodo bajo condiciones controladas.⁽¹⁹⁾

Tabla 4. Digestibilidad en diferentes muestras mezcla/proporciones en %

Mezcla	Proporción %	PER* corregido	Digestibilidad aparente
Quinoa	61	2.59	79.39
Kiwicha	19		
Frijol	20		
Quinoa	75	2.36	79.20
Cañihua	15		
Haba	10		
Kiwicha	56	2.48	80.60
Arroz	44		
Tarwi	47	1.35	82.03
Kiwicha	51		
Tarwi	51	1.34	83.77
Cañihua	49		
Caseína		2.50	

Fuente: Reupo – Carrasco, 1992. *Relación de eficiencia de proteína.

2.2.2. CALIDAD DE PROTEÍNAS

El análisis de las proteínas es de gran importancia para determinar el valor nutritivo de los alimentos. La calidad de una proteína esta definida por la cantidad y proporción de aminoácidos para satisfacer las necesidades nutricionales ⁽²⁰⁾.

En general, el contenido de aminoácidos esenciales en los alimentos es un buen indicador de la calidad de una proteína, particularmente si la digestibilidad es alta, por lo tanto; si se conoce el contenido de aminoácidos esenciales de un alimento y se comparan con un patrón de referencia, se puede calcular su calidad respecto a cada aminoácido. El contenido de aminoácidos esenciales de un producto es corregido con respecto al contenido de proteína y luego es comparado con el porcentaje de aminoácidos de la proteína de referencia, otorgándole así puntuación a cada aminoácido. Los aminoácidos esenciales son: metionina, cisteína, lisina, treonina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, tirosina y triptófano ⁽²¹⁾.

2.2.3. ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

La mayoría de procedimientos para el análisis de aminoácidos dependen del uso de métodos cromatográficos, en especial la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que constituye una técnica cuantitativa, rápida y altamente sensible, capaz de producir una buena resolución de compuestos químicamente similares, por ejemplo, aminoácidos y vitaminas. Esta técnica emplea columnas con diámetro de 2-5 mm, empacadas con partículas muy pequeñas (3-10 μ) y fases móviles cuyo flujo se controla de manera muy precisa. El único inconveniente de esta técnica se debe a la preparación de derivados antes o después de la separación cromatográfica; ya que, por sí solos los aminoácidos no son detectados fácilmente por UV o fluorescencia ^(21,22).

Tabla 5. Puntaje químico de algunos alimentos

Alimentos	PQ %
Leche	100
Huevo	100
Carne de res	100
Proteína aislada de soya	97
Frijol rojo	84
Arveja	82
Garbanzo	81
Frijol negro	74
Arroz	73
Avena	63
Lentejas	60
Haba	55
Trigo	44

Fuente: Torum, B. et. al. 1996. Recomendaciones dietéticas diarias del INCAP. Edición 45 Aniversario. INCAP/OPS. Guatemala.

Tabla 6. Las proteínas y aminoácidos de la semilla de *Plukenetia volubilis* L. versus diferentes semillas y patrones recomendados por la FAO/WHO/ONU

PROTEÍNAS Y AMINOÁCIDOS	SEMILLAS (2)					(3) Patrones FAO/WHO/ONU
	Sacha Inchi	Soya	Maní	Algodón	Girasol	
PROTEÍNAS (1)	27	28	23	23	24	.-
AMINOÁCIDOS ESENCIALES						
Histidina	26	25	24	27	23	19
Isoleucina	50	45	34	33	43	28
Leucina	64	78	64	59	64	66
Lisina	43	54	35	44	36	58
Metionina	12	13	12	13	15	.-
Cisteína	25	13	13	16	15	.-
Metionina + cisteína	37	26	25	29	34	25
Fenilalanina	24	49	50	52	15	.-
Tirosina	55	31	39	29	19	.-
Fenilalanina+tirosina	79	80	89	81	54	53
Treonina	43	39	26	33	37	34
Triptofano	29	13	10	13	14	11
Valina	40	48	42	46	51	35
AMINOÁCIDOS NO ESENCIALES						
Alanina	36	43	39	41	42	.-
Arginina	55	72	112	112	80	.-
Asparagina	111	117	114	94	93	.-
Glutamina	133	187	183	200	218	.-
Glicina	118	42	56	42	54	.-
Prolina	48	55	44	38	45	.-
Serina	64	51	48	44	43	.-
TEAA*	411	418	349	365	366	.-
TAA**	976	985	945	936	941	.-
TEAA (% de TAA)	42	42	37	39	39	.-

Fuente: Hamaker et al. 1992. Universidad de Arkansas, USA*TEAA= Aminoácidos esenciales totales

**TAA= Total de aminoácidos

1. Los valores están indicados en mg/g de proteínas
2. Valores para soya, maní, algodón y girasol (Bodwel y Hopkins (1985))
3. Niveles recomendados para niños en edad pre-escolar (2-5 años). La recomendación para la evaluación de la calidad de la dieta proteica para todos los grupos, a excepción de infantes (Expertos FAO/WHO 1990).

2.2.3.1. Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa

La cromatografía de intercambio iónico es el método de análisis de aminoácidos más utilizados; sin embargo, si el análisis no se lleva a cabo de manera rutinaria, los altos costos hacen que la cromatografía de fase reversa sea el método de elección ^(23,24).

En la cromatografía de fase reversa, la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil y se utilizan fundamentalmente dos tipos de fases estacionarias: partículas esféricas de poliestireno y divinilbenceno, unidos por enlaces cruzados; y el tipo más común lo constituyen partículas de sílice recubiertas por grupos no polares orgánicos como $-\text{CH}_3$, $-\text{C}_8\text{H}_7$ y $-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$. De éstas, las fases estacionarias de octadecilsilano (denominados ODS o C18) son las más populares y con menor frecuencia se utilizan las C8. La partición de los componentes de la muestra dependerá de sus respectivas características de solubilidad. Los componentes menos hidrofóbicos se asociaran primariamente con la fase hidrofílica, mientras que los componentes más hidrofóbicos se encontrarán en la fase lipofílica ⁽²³⁾.

En cuanto a las fases móviles empleadas en la separación de la fase reversa, los disolventes poco polares son eluyentes más poderosos y se presentan en gran variedad. La fase móvil puede ser considerada como una solución acuosa de un disolvente orgánico, el tipo y concentración determinarán su poder extractor. Algunos solventes orgánicos usados comúnmente para la hidrofobicidad son metanol, propanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano. La elección del componente orgánico depende de su selectividad para separar ciertos pares de aminoácidos y por la forma en que su presencia influye en la presión de la columna. Los cambios en el disolvente producen desplazamientos entre el equilibrio en las fases móviles y estacionarias ⁽²⁴⁾.

La separación cromatográfica se puede mejorar pasando de una elución isocrática (pasa un único eluyente) a una elución en gradiente; esta última se consigue mezclando dos o más eluyentes diferentes de manera que la composición de la fase móvil cambie con el tiempo ⁽²⁵⁾. Dependiendo del poder extractor del eluyente, una menor o mayor parte del componente de la muestra será retenido reversiblemente por la fase estacionaria. Los compuestos hidrofílicos se moverán siempre más rápido, ya que la fase móvil es siempre más hidrofílica que la fase estacionaria.

2.2.3.2. Métodos de derivatización para la separación cromatográfica de aminoácidos

La mayoría de los aminoácidos no derivatizados, no contienen cromóforos adecuados para su detección, excepto a longitudes de ondas muy cortas por ejemplo a 200nm, como hay muchos compuestos que se absorben a esta longitud de onda, pueden presentarse muchas interferencias; por lo tanto, los aminoácidos tienen que convertirse en derivados adecuados antes o después de la separación cromatográfica. Los procedimientos de derivatización se dividen en postcolumna y precolumna ⁽²⁶⁾.

La derivatización postcolumna involucra los siguientes pasos: separación de los aminoácidos en la columna cromatográfica, introducción de un reactivo de derivatización en el sistema de efluente de la columna; paso de los líquidos combinados a través de un colector mezclador seguido por una espiral de reacción (debe calentarse) y finalmente bombeo de los aminoácidos derivatizados a través de un sistema de detección. La separación se lleva a cabo mediante cromatografía de intercambio iónico.

En la derivatización precolumna la mezcla de aminoácidos reaccionan con el agente de derivatización antes de que los aminoácidos sean separados. Las técnicas difieren principalmente en las condiciones de reacción (temperatura, tiempo, separación del reactivo, estabilidad de los derivados, y método de detección). Una de las desventajas de esta técnica es que una porción sustancial de todos los derivados será idéntica (la parte del reactivo de derivatización). Las pequeñas diferencias entre las cadenas laterales de los aminoácidos derivatizados tendrán un efecto menor en el comportamiento cromatográfico de los aminoácidos. La derivatización precolumna elimina la necesidad de utilizar reactores postcolumna costosos, y los derivados hidrofóbicos de los aminoácidos pueden ser separados rápida y eficientemente con columnas de fase reversa. Estos sistemas, acoplados con detectores sensibles, permite la detección de aminoácidos presentes en concentración picomolar.

Aunque la derivatización precolumna ofrece las ventajas mencionadas, no se ha podido desplazar completamente a los métodos postcolumna tradicionales; para la aplicación del análisis de aminoácidos de manera rutinaria, por lo que el agente de derivatización precolumna debe satisfacer los siguientes requerimientos:

- 1) Debe reaccionar rápidamente bajo condiciones moderadas para obtener rendimientos cuantitativos del derivado.
- 2) Debe reaccionar tanto con aminoácidos primarios como secundarios.
- 3) Los derivados deben ser estables por varios días, de preferencia a temperatura ambiente para permitir el análisis automatizado de varias muestras.
- 4) No debe haber interferencia del reactivo, productos de rupturas o reacciones secundarias.
- 5) Debe presentar respuesta lineal a los intervalos de concentración típicos de la mayoría de las aplicaciones.
- 6) Los derivados deben poseer factores de respuesta molar razonablemente similares.

Se han investigado diferentes reactivos de derivatización precolumna, pero ninguno ha podido alcanzar una aceptación universal debido a que no cumplen con uno o mas de los requerimientos mencionados anteriormente para esta técnica.⁽²⁷⁾

Tabla 7. Reactivos de derivatización

REACTIVOS	Complejos con:	Método de separación	Post- o pre-columna	Detección
Ninhidrina	1 ^{os}	CIC o electroforésis	Post-	VIS 570 nm
OPA	1 ^{os}	CFR (en post-columna,CIC)	Pre- y post-	Fluorescencia
Fluorescamina	1 ^{os}	CIC o electroforésis	Post-	Fluorescencia
PITC	1 ^{os} y 2 ^{os}	CFR	Pre-	UV 240-255 nm
Cloruro de dansilo	1 ^{os} y 2 ^{os}	CFR	Pre-	Fluorescencia
Cloruro de dabsilo	1 ^{os} y 2 ^{os}	CFR	Pre-	VIS
FMOC-Cl	1 ^{os} y 2 ^{os}	CFR	Pre-	Fluorescencia
NBD-Cl	1 ^{os} y 2 ^{os}	CFR	Pre- y post-	Fluorescencia
NBD-F	1 ^{os} y 2 ^{os}	CFR	Pre- y post-	Fluorescencia

Fuente: Quattrocchi, A; Abelaira, S; Laba, R. Introducción a la HPLC.

2.2.3.3. Reactivos de derivatización de precolumna

2.2.3.3.1. Ortoftalaldehido (OPA)

Es el reactivo de derivatización más comúnmente usado en la cromatografía de fase reversa. La reacción entre el OPA y los aminoácidos primarios tienen lugar en presencia del grupo tiol como el del 2-mercaptoetanol o etanodiol para formar derivados altamente fluorescentes. La ventajas que presenta este método de derivatización es que la reacción se lleva a cabo rápidamente (1 minuto a temperatura ambiente), midiendo la emisión a longitudes de onda superior a 430nm .

No es necesario remover el exceso de OPA antes de la inyección de la muestra ya que OPA por sí no interfiere con la separación o la detección. Sin embargo; los derivados de OPA- aminoácidos, son inestables.

El OPA no reacciona con aminoácidos secundarios. Esta desventaja puede solucionarse mediante la adición de un segundo reactivo de derivatización, utilizandose comúnmente 9- Fluorenilmetil cloroformato.^(23, 26)

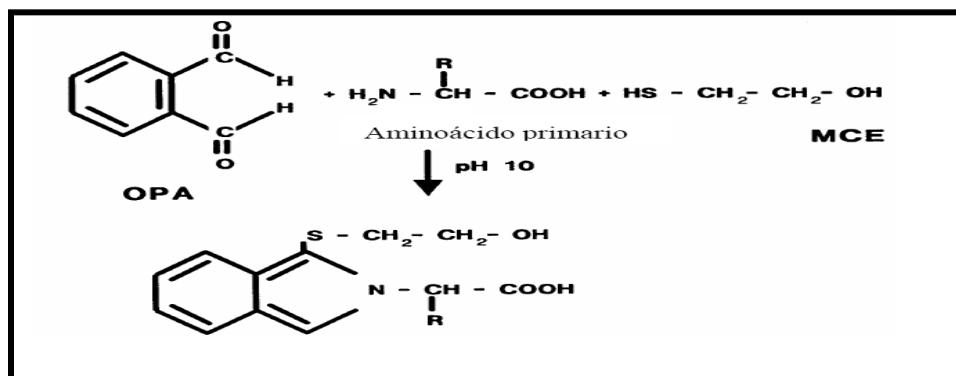


Figura 2. Reacción de los aminoácidos con opa.mce=mercaptoetanol.

Fuente: Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods Chemistry.1995; 54:101-111. **Hart, D.; Sccott, J.**

2.2.3.3.2. Fenilisotiocianato (PITC)

El fenilisotiocianato ha sido utilizado por más de 30 años en la degradación de Edman para secuenciar péptidos y proteínas. El PITC reacciona con los aminoácidos libres para dar feniltiocarbamilaminoácidos. Con este método se puede cuantificar aminoácidos secundarios como la prolina y la hidroxiprolina, así como, los productos de oxidación de la metionina y cisteína, metionina sulfato y ácido cisteico, respectivamente. Bajo condiciones moderadas, la reacción es prácticamente completa entre los 5 a 10 minutos; ya que el reactivo es volátil, se puede usar en exceso y eliminarlo fácilmente bajo presión reducida en un rotavapor⁽⁵⁰⁾. Aunque, no es tan sensible como algunos reactivos fluorescentes, sus derivados pueden cuantificarse en niveles picomolares en la región ultravioleta a 254 nm. Estos derivados pueden ser estables hasta por cuatro semanas a -20°C ^(23,26).

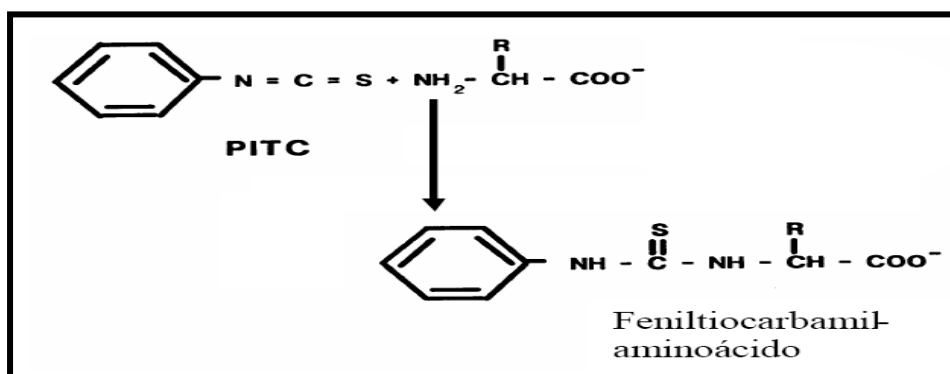


Figura 3. Reacción de derivatización de los aminoácidos con PITC

Fuente: Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods Chemistry.1995; 54:101-111. **Hart, D.; Sccott, J.**

2.2.3.3.3. Fluorenilmetil cloroformato (FMOC-Cl)

Otro reactivo fluorescente de derivatización precolumna es el FMOC-Cl. Originalmente se usó como un reactivo protector del grupo amino durante la síntesis de péptidos. Reaccionan rápidamente con todos los aminoácidos a temperatura ambiente, pero más lentamente que el OPA. Los derivados son estables y pueden almacenarse por varios días en el refrigerador ⁽²⁶⁾.

2.2.3.3.4. Cloruro de dansilo

El cloruro de dansilo es un reactivo de derivatización fluorogénico para la determinación de aminas secundarias y primarias. La dansilación ha sido ampliamente utilizada como un método para determinar aminoácidos. Los aminoácidos dansilados son altamente fluorescentes (excitación: 360nm-emisión: 470nm), siendo posible detectarlos en la región ultravioleta (250nm). Los niveles de detección caen dentro del intervalo picomolar ⁽²⁶⁾.

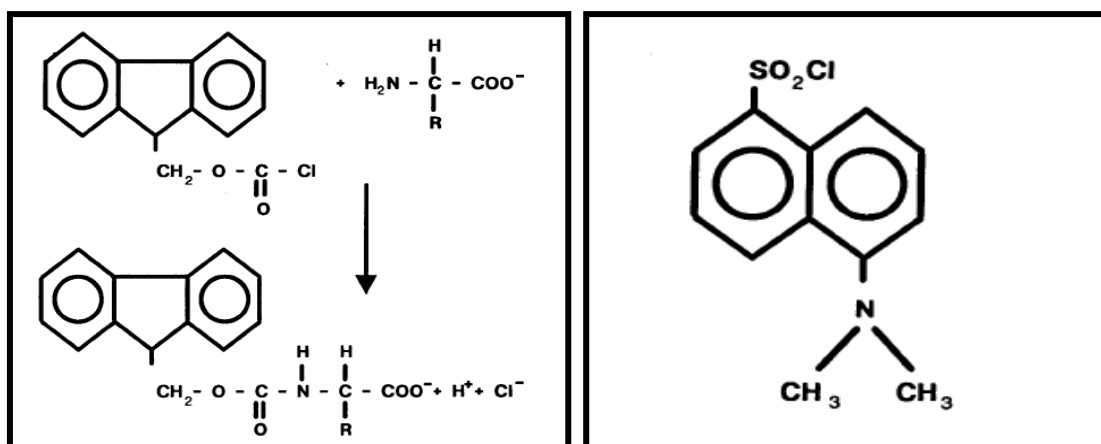


Figura 4. A la izquierda muestra la reacción de derivatización de aminoácidos con FMOC-CL. A la derecha, estructura del cloruro de dansilo

Fuente: Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods Chemistry.1995; 54:101-111. **Hart, D.; Sccott, J.**

2.3. FIBRA DIETÉTICA

La fibra dietética o fibra alimentaria es un conjunto de componentes, procedentes de las paredes de las células vegetales (celulosa, hemicelulosa, lignina y otras), que no son hidrolizables por las secreciones endógenas del aparato digestivo humano.

Dentro de la fibra alimentaria podemos distinguir una parte que puede ser fermentada por la flora bacteriana del intestino, que se conoce como fibra soluble, y el resto no fermentable, que se denomina fibra insoluble.

2.3.1. INTERÉS DE LA FIBRA DIETÉTICA

La fibra insoluble circula por el intestino delgado sin ser digerida, por lo que llega más o menos intacta al colon y ejerce efecto laxante.

La fibra soluble se degrada parcialmente por la flora del colon y libera ácidos de cadena corta que pueden ser parcialmente absorbidos y metabolizados. Los principales ácidos producidos por fermentación de la fibra soluble son: ácido butírico, ácido propiónico y ácido acético. La acidez que producen dificulta el crecimiento de microorganismos patógenos y tienen un efecto antiinflamatorio, con una acción protectora frente a la colitis ulcerosa.

La fibra consumida en cantidades adecuadas presenta una serie de ventajas sobre el tránsito gastrointestinal, que repercute directa en la prevención y evolución de ciertas patologías tal y como se indica en la tabla N° 8.


Un exceso de fibra en la dieta puede causar trastornos como: problemas de malabsorción de nutrientes y un tránsito excesivamente rápido de las heces. La ingesta de fibra recomendada diaria es de 30 – 40g/día.⁽¹⁸⁾

Tabla 8. Beneficio de la fibra soluble e insoluble en la salud

Efecto	Debido a	Beneficio sobre:
Sensación de saciedad	Fibra soluble Fibra insoluble	Obesidad
Modifica volumen de heces Modifica consistencia de heces Disminuye el tiempo de tránsito intestinal Facilita la excreción	Fibra soluble Fibra insoluble	Estreñimiento Diverticulosis Megacolon Cáncer de colon
Disminuye la absorción del colesterol Disminuye la absorción de ácidos biliares Facilita su eliminación fecal	Fibra soluble	Aterosclerosis Trastornos cardiovasculares
Disminuye la absorción de glúcidos Retrasa la absorción de glucosa Disminuye el índice de glucemia	Fibra soluble	Diabetes
Mantenimiento y desarrollo de la flora bacteriana	Fibra soluble	Protección frente a infecciones bacterianas

Fuente: Kuklinski, C. 2003. Nutrición y Bromatología. pág 23.

Tabla 9. Clasificación de la fibra según grado de fermentabilidad.

FIBRA ALIMENTARIA  No digerible	Fibra soluble	Gomas Mucílagos Pectinas Inulina	Fermentable por una parte de la flora microbiana intestinal dando ácidos grasos de cadena corta
	Fibra insoluble	Celulosa Hemicelulosa Lignina	No digerible No fermentable No absorbible

Fuente: Kuklinski, C. 2003. Nutrición y Bromatología.

2.4. POTENCIAL INDUSTRIAL

El cultivo de *Plukenetia volubilis* L., significa un gran potencial para el sector agrario y de la industria nacional, pero el mundo todavía no conoce de sus virtudes; sin embargo, una somera proyección tendría como mira atender el mercado japonés y europeo que demandan 200 toneladas de aceite al año.

La Ley N° 11367 – 2004 ha declarado a *Plukenetia volubilis* L. como patrimonio genético nacional y producto alternativo de la pobreza. En el artículo 107 de la Constitución Política del Perú y en concordancia con el artículo 75 del Reglamento del Congreso propone al Congreso de la República lo siguiente: se declaró al sacha inchi como un importante recurso genético y un valioso aporte de nuestra amazonía peruana a la humanidad por sus cualidades nutraceuticas, alimenticias, cosméticas y otras ⁽⁸⁾.

La especie vegetal *Plukenetia volubilis* L. , es considerada por el Programa Amazónico Regional de Biocomercio, PROMPEX y Consejo Nacional de Ambiente – CONAM para aplicación industrial con gran potencial dentro del grupo de ingredientes naturales, cosméticos y alimenticios ⁽²⁸⁾.

Luego de la extracción del aceite queda una torta con alto valor nutritivo que puede sustituir a la torta de la soya que es importada en cantidades apreciables para la crianza de monogástricos en la amazonía peruana ⁽²⁹⁾.

En la Universidad de San Martín en Tarapoto, se está realizando investigaciones para cultivar *Plukenetia volubilis* L., y evaluar su uso como suplemento en la alimentación de aves de corral ⁽²⁹⁾.

Plukenetia volubilis L., puede ser consumido tradicionalmente y convertido en harinas, pepián, ocopa, tamales, mazamorra, juanes e inchicapi ⁽⁸⁾.

El Programa de Nutrición y la Agencia Adventista de Desarrollo y Recursos Asistenciales (ADRA), han preparado un recetario popular para su consumo directo e informó que el producto residual de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L., se está promoviendo para ser consumida en la dieta de 37,000 familias de nueve departamentos con altos porcentajes de desnutrición ⁽⁸⁾. En base a la elevada cantidad de proteínas de los residuos de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L., se están realizando concentrados proteicos de harina desengrasada para lactantes ⁽¹⁹⁾. En la Universidad San Ignacio de Loyola, en el año 2006, se ha realizado la elaboración, producción y caracterización de mantequilla de *Plukenetia volubilis* L. ⁽³⁰⁾.

2.4.1. EL MERCADO DE SACHA INCHI

Mercedes Inés Carazo, Coordinadora Nacional de la Red de Centros de Innovación Tecnológica (CITES), ha señalado que el mercado externo para plantas alimenticias, medicinales y cosméticas es grande, pero que la oferta no cubre la demanda actual, asimismo, la demanda mundial de estos productos ha venido creciendo y se estima que seguirá creciendo en los próximos años. Antonio Brack sostenía: "La demanda de los productos naturales en los países del primer mundo crece entre 15 y 20% anualmente ^(8,31).

Aunque, las comunidades indígenas de las selvas amazónicas utilizan *Plukenetia volubilis* L. desde tiempos milenarios, la industrialización y comercialización de este producto es reciente, lo que se debe a la difusión de nuevos estudios que destacan su alto contenido de Omega 3 y Omega 6, proteínas y antioxidantes ⁽³²⁾.

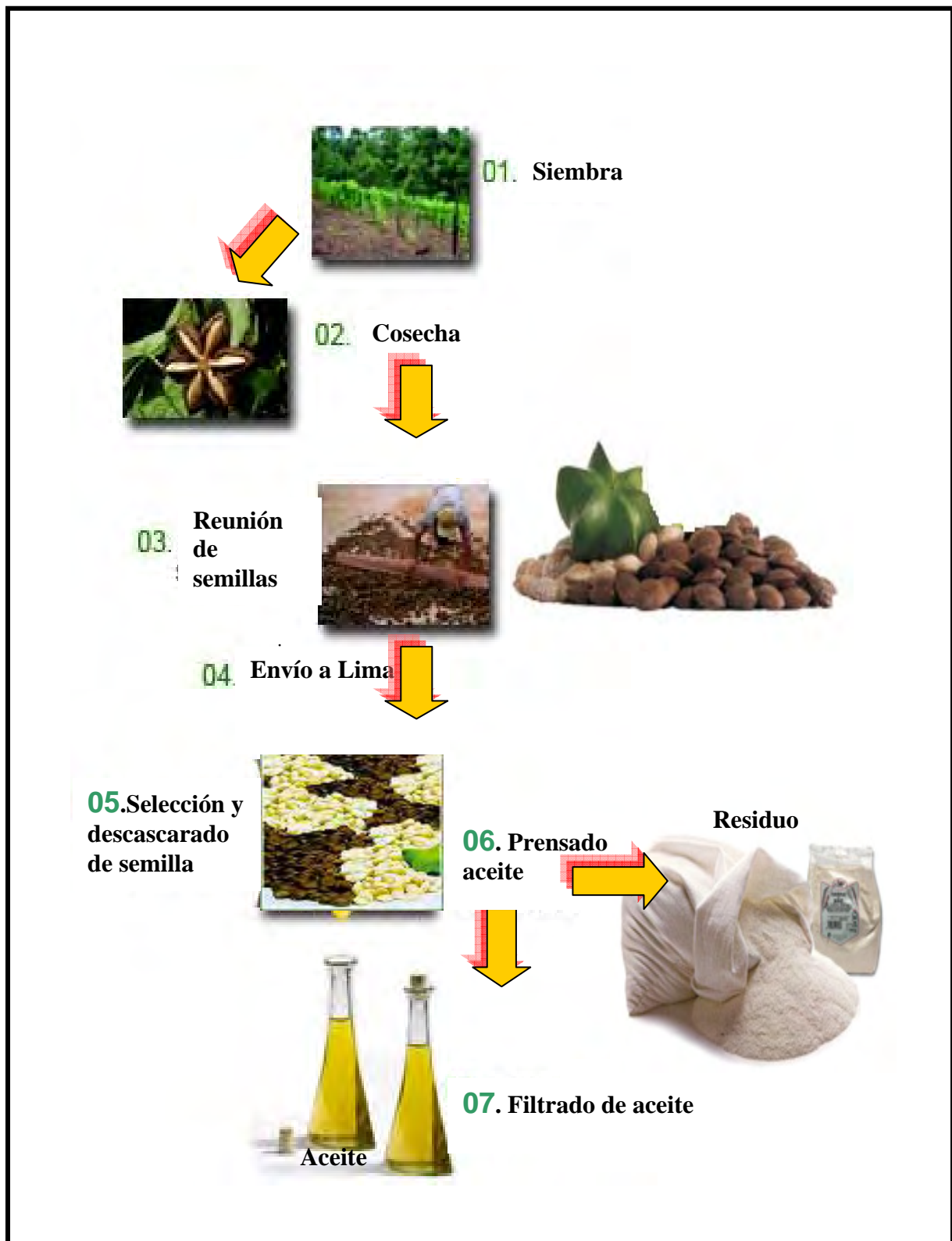


Figura 5. Proceso de extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L. , y obtención del residuo

Fuente: Prensado en frío .Katherine Rocío Chacón Bringas.USMP

El aceite de *Plukenetia volubilis* L., no tiene partida arancelaria específica. Los flujos de comercio se registran bajo la partida 33.01.29.90.00 cuya descripción corresponde a “los demás aceites esenciales”⁽³³⁾.



Figura 6: Exportaciones de productos naturales (1996-2010)

Fuente: ADEX

2.4.1.1. Comercio internacional

Las perspectivas del aceite de *Plukenetia volubilis* L., en el mercado internacional son favorables gracias a las tendencias del mercado en el campo de la salud y de la nutrición. Una prueba de esto es el premio que recibió en los años 2004 y 2006 como el mejor aceite del mundo en el World Ethnic & Specialty Food Show que se celebra anualmente en París⁽³⁴⁾.

El reconocimiento que se da a *Plukenetia volubilis* L., en el mercado internacional ha logrado que el gobierno peruano proyecte invertir en la ampliación de la producción, industrialización y comercialización en conjunto con el sector privado; creándose el proyecto Omega que vincula asociaciones de productores, empresas y entidades estatales de investigación en torno a este aceite esencial. Este proyecto incluye la producción de aceite de *Plukenetia volubilis* L., ecológico.^(32, 34)

Otras iniciativas llevadas a cabo en Perú a favor del aceite de *Plukenetia volubilis* y sus subproductos son el registro de la marca inca inchi en los mercados en los que se comercializa actualmente (Japón, Europa y Estados Unidos) y la gestión de la patente de la semilla en los mercados internacionales ⁽³³⁾.

2.4.1.2. Comercio nacional

De acuerdo con ADEX (Asociación de Exportadores del Perú) entre enero y septiembre del 2005, Perú exportó aceite de *Plukenetia volubilis* L., por un valor aproximado de trece mil dólares. Los principales destinos fueron Francia, 92%; Italia, 6% y Japón, 2%. ⁽³⁵⁾

En los últimos años, el Perú ha presentado una creciente tendencia exportadora en dólares americanos, tabla N° 10 y figura N° 7 ⁽³²⁾.

Tabla 10. Exportación de productos naturales en dólares americanos

Producto	2005	2006	2007
Yacón	101,948	221,456	229,023
Maca	3 600,000	3 700,000	4 017,000
Sacha inchi	25,194	113,255	422,559
Camu camu	906,000	2 100,000	5 000,000

Fuente: Superintendencia Nacional de Administración Tributaria



Figura 7: Evolución de las exportaciones de *Plukenetia volubilis* L. y derivados

Fuente : Superintendencia Nacional de Administración Tributaria

Elaboración : Biocomercio Perú / PROMPEX

Es cualquier objeto material, elemento sólido, líquido o gaseoso; resultado del consumo o uso de un bien en actividades domésticas, industriales, comerciales o institucionales, que el generador abandona, rechaza y que es susceptible de aprovechamiento o transformación en un nuevo bien, con valor económico o disposición final ⁽³⁶⁾.

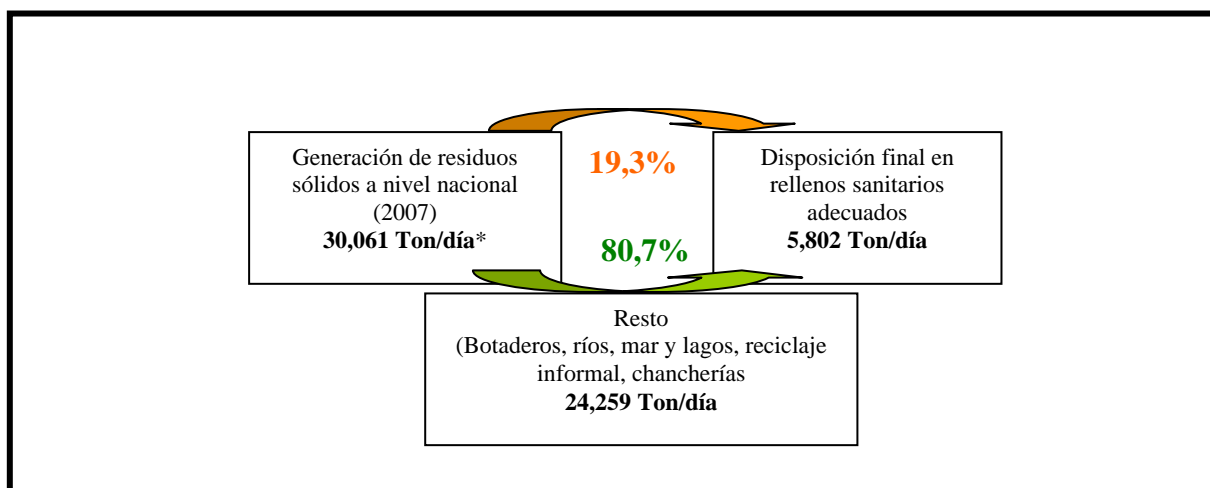


Figura 8: Estimación de residuos basada en el total de población del país

Fuente: Ministerio Del Ambiente, 2008

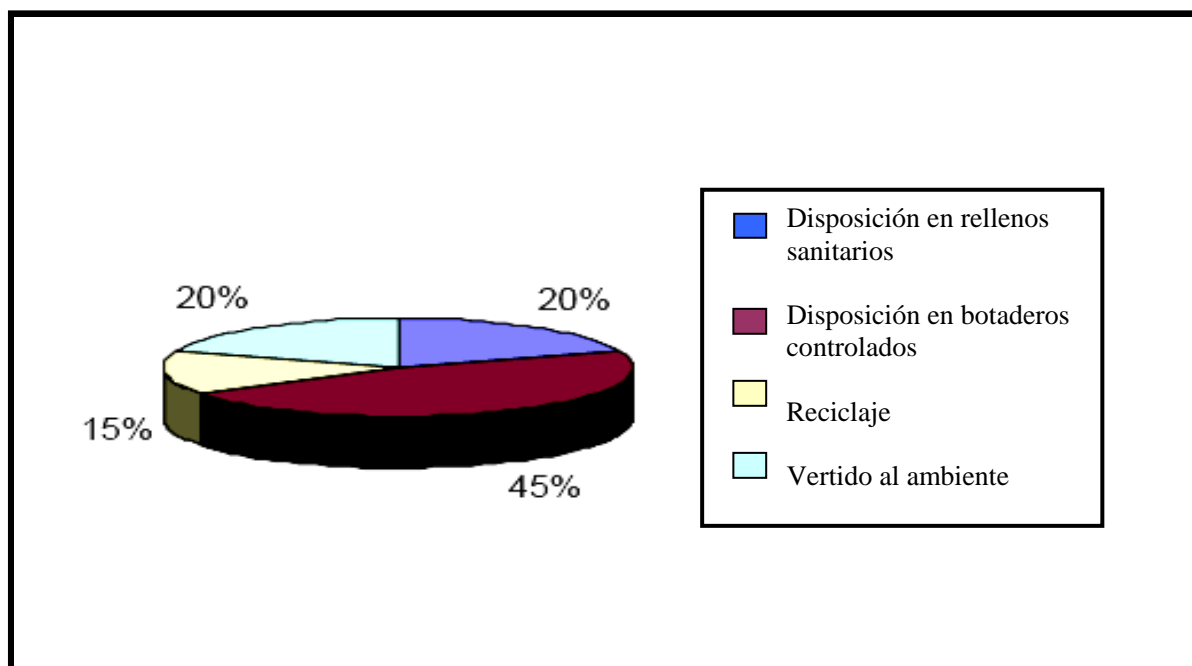


Figura 9. Disposición final de residuos sólidos

Fuente: Encuesta Nacional de la evaluación regional de los servicios de manejo de los residuos, 2002

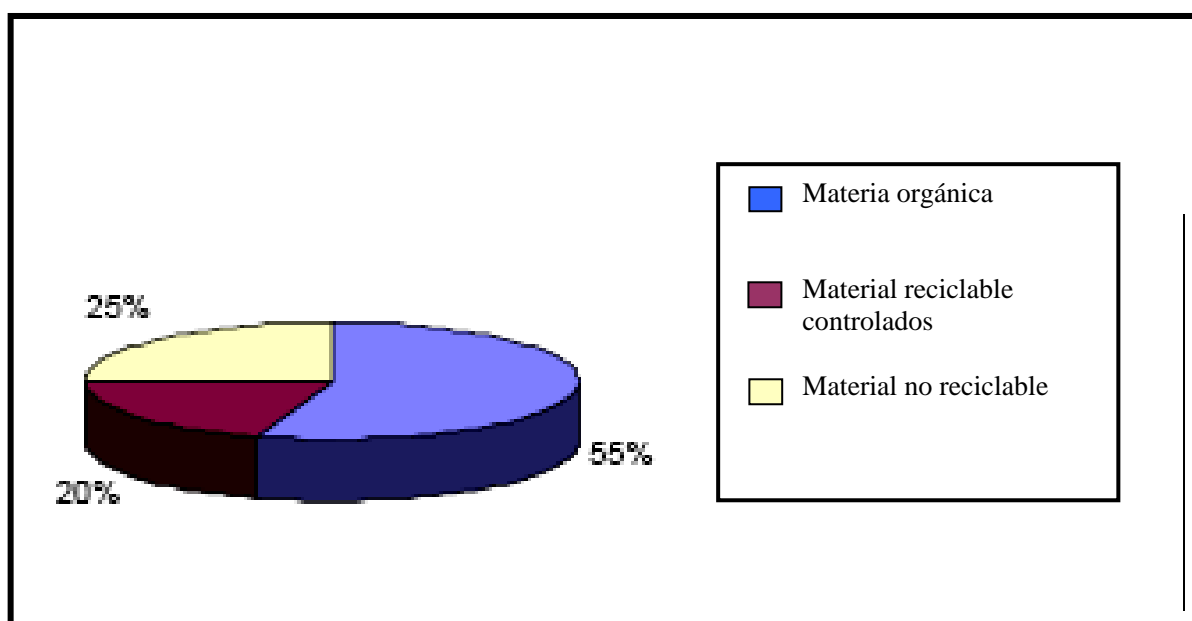


Figura 10. Composición de los residuos sólidos

Fuente: Encuesta Nacional de la evaluación regional de los servicios de manejo de los residuos, 2002

Tabla 11. Composición de residuos sólidos municipales

	%	Ton/día	Fuente de Residuos orgánicos 1. Actividad agropecuaria 2. Actividad agroindustrial 3. Industria láctea 4. Industria frigorífica 5. Industria de cereales 6. Industria aceitera y de granos oleosos 7. Industria de la pesca 8. Industria forestal 9. Resíduos sólidos urbanos 10. Resíduos sólidos domiciliarios
Papel	6.49	842.81	
Cartón	0.97	125.97	
Plásticos	4.30	558.41	
Vidrios	3.39	440.23	
Metales ferrosos	2.20	285.70	
Metales no ferrosos	0.16	20.78	
Textiles y trapos	1.56	202.58	
Cueros y caucho	0.30	38.96	
Maderas	0.93	120.77	
Otros	25.20	3272.53	
Orgánicos	54.50	7077.49	
	100.00	12986.23	

Fuente: Encuesta Nacional de la evaluación regional de los servicios de manejo de los residuos, 2002

2.4.2.1. Normatividad y gestión de residuos sólidos en el Perú ⁽³⁷⁾

- Ley General de Residuos sólidos, Ley N° 27314
- Reglamento de la Ley General de residuos sólidos, D.S. N°057-2004-PCM
- NTP 900.058-GESTION AMBIENTAL. Gestión de Residuos.
- Ordenanza 295-2001/MML.Sistema Metropolitano de Gestión de Residuos sólidos.

2.4.2.2. Manejo de residuos sólidos en el Perú

La Ley General de residuos sólidos – Ley N° 27314-, en el Título III, capítulo I, artículo 14; establece las operaciones para un adecuado manejo de residuos sólidos en virtud a lo establecido en la normatividad nacional para evitar los riesgos que causan a la salud y el ambiente, y estas son ⁽³⁷⁾:

1. Minimización de residuos
2. Segregación en la fuente
3. Reaprovechamiento
4. Almacenamiento
5. Recolección

6. Comercialización
7. Transporte
8. Tratamiento
9. Transferencia
10. Disposición final

Si bien las industrias de productos alimenticios y bebidas no contaminan tanto como otros sectores⁽⁶⁾, también han sido responsables de la contaminación del aire y del agua al despedir polvos y olores desagradables en la atmósfera, descargar efluentes líquidos con un elevado contenido orgánico y generar grandes cantidades de sedimentos y residuos sólidos; por ejemplo, algunas empresas dedicadas a la producción de fécula de patata producen anualmente entre 100,000 y 250,000 m³ de almidón. En el sector de la conservación y elaboración de hortalizas, se puede desechar hasta un tercio del volumen total de materias primas. La elaboración de aceite comestible genera cantidades considerables de residuos sólidos y líquidos, tales como fibras, cáscaras y residuos resultantes de la extracción de aceites y grasas ^(38,39).

En respuesta a la aplicación de una reglamentación más estricta del medio ambiente por muchas comunidades, varias fábricas de productos alimenticios y bebidas han instalado aparatos modernos para el tratamiento de la biomasa residual. Los desechos vegetales que solían verterse en el océano se utilizan ahora como alimento para animales, aunque esta actitud no se considere nueva tecnología ⁽³⁹⁾.

Las empresas japonesas que tratan el residuo de la extracción de aceite, transforman los residuos sólidos en diversos fertilizantes orgánicos y naturales para la jardinería. Esto no sólo ha reducido el volumen de desechos generados sino que también ha permitido que las empresas desarrollen actividades en un nuevo sector, generando rentabilidad. ^(39,40)

2.4.2.3. Residuos de acuerdo a la extracción de aceite

Durante el proceso de extracción de aceites se generan subproductos como harinas, expeller, cascarillas, gomas, lecitina que son ampliamente utilizados para la industria en general, la alimentación humana y animal.

Se entiende por subproductos oleaginosos, a los residuos sólidos resultantes de la extracción industrial del aceite de granos oleaginosos, obtenidos por presión y/o disolvente, provenientes de la elaboración de mercadería normal, sin el agregado de cuerpos extraños ni aglutinantes.

En función del proceso de industrialización que se somete a la materia prima, se ha establecido para la comercialización de estos insumos la siguiente clasificación:

a) Expellers: residuos de elaboración por prensa continua.

b) Harina de extracción: residuos de la elaboración por disolvente y salvo estipulación especial no se diferencian por su granulación, pudiendo ser: fina, en grumos, aglomerados o pedazos, según los distintos sistemas de extracción y secado.

c) Pellets: comprimidos (cilindros) provenientes de los residuos de la extracción del aceite de los granos oleaginosos definidos anteriormente. El largo y el diámetro de los comprimidos podrán ser de cualquier medida, salvo estipulaciones expresas en el boleto de compra-venta.

La referencia a “expeller” significa material de extracción por prensado, “harina” es el material obtenido por solvente y “pellets” se denomina a la forma física (comprimidos) de presentación de estos subproductos⁽⁴¹⁾.

En el Perú la principal forma de extracción de aceites se realiza combinando presión-solvente (P-S), debe considerarse que cuando se habla de “pellets” (los cilindros compactos de largo y diámetros variables) pueden fabricarse tanto a partir de expeller como de harinas o la combinación presión-solvente.

2.4.2.4. Efecto de la temperatura en la calidad de los residuos

La composición química y el valor nutritivo de estos residuos industriales son muy variables. El método industrial utilizado para la extracción de aceite, junto a la calidad de la materia prima de origen representan las fuentes de variación más importantes. Es fundamental el correcto control de la temperatura durante el proceso de manufactura porque la falta de cocción puede causar serios problemas de salud y desempeño de los animales (monogástricos y rumiantes muy jóvenes); sin embargo, los excesos de calor también pueden dañar la calidad de las proteínas. Si las temperaturas son excesivamente altas y aplicadas por tiempos muy prolongados las proteínas cambian su configuración; ya que, el exceso de calor conduce a la formación de productos indigeribles, a través de la conocida reacción de Maillard. La reacción de Maillard constituye un proceso no-enzimático de “caramelización”, donde los residuos de los azúcares se condensan con ciertos aminoácidos, seguido de una polimerización, para formar una sustancia de color marrón que posee muchas de las características químicas de la lignina⁽¹⁸⁾.

2.5. DESARROLLO SOSTENIBLE

De acuerdo William Hughes, “el desarrollo sostenible implica que el ser humano es el centro de todo desarrollo, promoviendo una vida saludable y productiva en armonía con la naturaleza” ⁽⁴²⁾. Este concepto sugiere la búsqueda de la satisfacción de las necesidades actuales no comprometan la capacidad de que las generaciones futuras también puedan lograrlo, incluyendo de esta manera, al medio ambiente. El desarrollo sostenible es un concepto que se ha venido desarrollando en las últimas décadas. Implica el manejo integrado de los recursos naturales mediante la aplicación de políticas eficientes que permitan un balance entre el desarrollo y la conservación tomando en cuenta las necesidades de las generaciones presentes y futuras. La importancia y trascendencia que tiene el manejo sostenido de los recursos naturales, así como la preservación de la biodiversidad; pero sobre todo, la necesidad de buscar tecnologías limpias, políticas adecuadas y permitir la activa participación de los pobladores locales para lograr el desarrollo sostenible en el Perú, brindando bienestar y una mejor calidad de vida a largo plazo.

Existen cuatro hipótesis que se pudieran esbozar sobre la correlación del desarrollo humano y los factores ambientales, a saber según Mallela V. Pérez Palomino ⁽⁴³⁾:

- La contaminación ambiental incide negativamente en el desarrollo humano,
- Un proceso productivo que degrade el ambiente convierte el desarrollo humano en no sostenible,
- El ambiente contaminado perjudica la vida vegetal y animal del planeta; y a la postre,
- La degradación de los ecosistemas implicará una variable negativa del desarrollo.

La base legal en el Perú para el desarrollo sostenible constituye ⁽⁴⁴⁾

1. Ley Orgánica del Sector de Agricultura, D. Ley N° 25902
2. Ley N° 26821 “Ley Orgánica para el Aprovechamiento sostenible de los recursos naturales.
3. Ley N° 26834 “Ley de áreas naturales protegidas”

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

MATERIALES

- Bureta
- Crisoles de porcelana
- Crucibles para ceniza
- Dedales celulósicos de extracción.
- Desecador.
- Portadedales de vidrio.
- Tubos de digestibilidad 20 x 2.5 cm.
- Capilares.
- Cromatofolio “**Merck Silicagel 60 F254**”.
- Embudos.
- Fiolas de 25,50,100 mL.
- Frascos de vidrio.
- Matraz 250 ml.
- Papel “**Whatman N° 1**”.
- Papel picrosado.
- Pera de decantación.
- Pipetas 1, 2, 5, 10 mL.
- Probetas de 50 mL.
- Bolsa de diálisis.
- Columna gel Sephadex G- 25
- Hilo dental
- Tubos eppendorff.
- Cánula intragástrica.
- Jaulas de acero inoxidable
- Jeringas y agujas
- Vasos de extracción “Goldsfich”

MATERIAL BIOLÓGICO

- 20 ratas albinas Sprangue Dawley

EQUIPOS

- Agitador magnético.
- Balanza analítica marca **“OHAUS Pioner”**.
- Bomba de vacío.
- Cocinilla eléctrica.
- Colector de fracciones marca **“LKB BROMMA 7000 ULTROPAC”**.
- Columna para HPLC de fase reversa Octadecilo (C18) **“MERCK”**.
- Cromatografía líquida de alta performance (HPLC) marca **“WWR HITACHI- EZChrom Elite”**.
- Equipo Macro Kjeldahl **“SISTEMA TECATOR”**.
- Equipo para digestión con calentadores individuales y condensadores.
- Espectrofotómetro UV- visible marca **“CARY 50 CONC eQUIPO”**.
- Estufa con aire circulante marca **“MEMMERT”**.
- Extractor tipo Goldsich.de 6 unidades.
- Lámpara de luz ultravioleta 365nm.
- Liofilizador marca **“VIRTIS”**.
- Microcentrífuga **“EPPENDORF”**.
- Mufla de incineración **“DERIVER INSTRUMENT COMPANY”**.
- Reacti-Therm marca **“PIERCE”**.
- Rotavapor rotatorio marca **“BUCHI modelo R-205”** con BM 60°C.

REACTIVOS

a) Solventes:

- Acetato de amonio **“SIGMA Chemical co”**.
- Acetona **“Merck”**.
- Acetonitrilo grado HPLC **“SIGMA Chemical co”**.
- Ácido clorhídrico 10% **“Colman”**.
- Ácido clorhídrico concentrado **“Colman”**.
- Ácido fosfomolibdico hidratado **“Merck”**.
- Ácido sulfúrico concentrado **“Colman”**.
- Cloroformo **“Colman”**.
- Etanol de 96°
- Éter de petróleo **“Colman”**.

- Éter dietílico anhidro Q.P. **Merck**
- Hidróxido de amonio “**Merck**”.
- Metanol Q.P. **Merck**
- N-Butanol “**Colman**”.
- N-Hexano “**Colman**”.
- Trietilamina Q.P. “**SIGMA Chemical co**”.

b) Reactivos :

- Ácido clorhídrico 6N “**Colman**”.
- Ácido sulfúrico 0.1 N “**Colman**”.
- Ácido sulfúrico al 1.25%.
- Asbesto preparado “**SIGMA Chemical co**”.
- Ácido clorhídrico 6N “**SIGMA Chemical co**”.
- Ácido fosfórico “**SIGMA Chemical co**”.
- Agua destilada, bidestilada.
- Buffer Tris HCl 50 Mm pH 6.5 “**SIGMA Chemical co**”.
- Catalizador.
- Fenilisotiocianato (PICT) “**SIGMA Chemical co**”.
- Fenol “**SIGMA Chemical co**”.
- Fosfato monopotásico Q.P. “**SIGMA Chemical co**”.
- Hidróxido de sodio al 1.25% “**SIGMA Chemical co**”.
- Indicador “Tashsiro”.
- Molibdato de amonio “**SIGMA Chemical co**”.
- Piridina “**SIGMA Chemical co**”.
- Solución Buffer acetato 0.1 M.
- Solución de Ácido bórico 3%.
- Solución Detergente Neutro (FDN).
- Standard de aminoácidos “**SIGMA Chemical co**”.
- Sulfato de amonio “**SIGMA Chemical co**”.

c) Reactivos cromógenos:

- Ácido Tánico St. “**Colman**”.
- Alcohol amílico “**Colman**”.
- Caolín “**SIGMA**”.
- Carbonato de sodio “**Merck**”.
- Cloruro de cobalto “**Colman**”.
- Cloruro de sodio “**Merck**”.
- Fehling A.
- Fehling B.
- Gelatina 25%.
- Hidróxido de potasio “**Merck**”.
- Hidróxido de sodio “**Merck**”.
- Magnesio metálico.
- Ninhidrina.
- Reactivo de Baljet.
- Reactivo de Dragendorf.
- Reactivo de Keller-Killiani.
- Reactivo de Mayer.
- Reactivo de Molish.
- Saponina St. “**Merck**”.
- Solución tricloruro ferrico 5%.
- Tungstato de sodio dihidratado “**Merck**”.

ENZIMAS:

- Celulasa del hongo *Penicillium funicullosum* E.C. 3.2.1.4. “**SIGMA chemical co**”.
- Pepsina N.F. XII (The proteolytic enzyme obtained from the glandular layer of fresh pig stomach standardized according to the method given in the National formulary 12 th edition. DIFCO Laboratories. Detroit- Michigan. USA.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. OBTENCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Los residuos de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L., “sacha inchi” pertenecientes al ecotipo Pinto Recodo de la provincia de Tarapoto del departamento de San Martín y clasificados como residuos tipo expeller fueron proporcionados por la Cátedra de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM en septiembre del 2007.¹

Los residuos de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L., se encontraban distribuidos en 14 bolsas de polietileno herméticamente cerradas con un peso promedio de cada bolsa de 2 Kg. con 600g, presentó las siguientes características al realizar el muestreo: polvo heterogéneo, color crema, olor sui generis y sabor amargo astringente. Se procedió a tomar una muestra representativa (200g), aleatoria, homogénea y en cantidad suficiente con la ayuda de una cuchara medidora (20g).

La muestra se tamizó y se secó en estufa a 40° C durante 72 horas. Luego se envasó en frascos herméticos de vidrio ámbar, rotulándose (nombre y fecha) y se almacenó en refrigeración.

3.2.2. ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO

3.2.2.1. Análisis cualitativo

El residuo seco (30g) se sometió a extracciones sucesivas, figura N°11. A cada extracto (etéreo, alcohólico y acuoso) se determinó su concentración (g/mL), se tomó una alícuota de 5mL, se evaporó a sequedad en baño de agua en una placa petri tarada y se pesó ⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾.

Posteriormente a cada extracto, se procedió con la marcha fitoquímica de acuerdo a las figuras N° 12, 13 y 14.

1 Obtenidos del estudio de investigación: “Caracterización química, farmacológica y toxicológica del aceite de sacha inchi destinada al mercado de productos funcionales”. Esta investigación la hicieron la UNMSM en convenio con la Empresa Agro negocios PERUAGRO SRL.2007

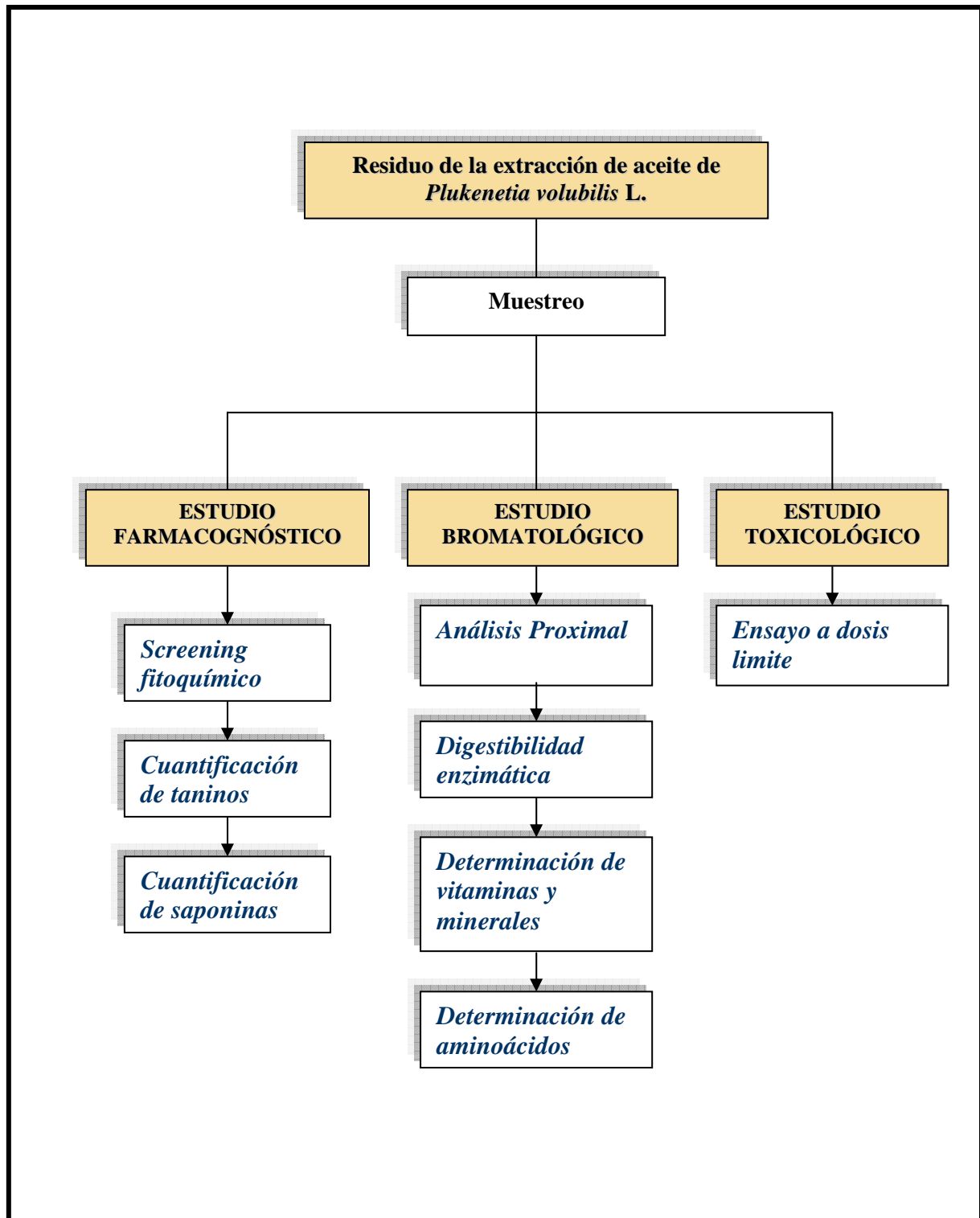


Figura 11. Diagrama de flujo del estudio de toxicidad realizado a los residuos de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L. “(sacha inchi)”

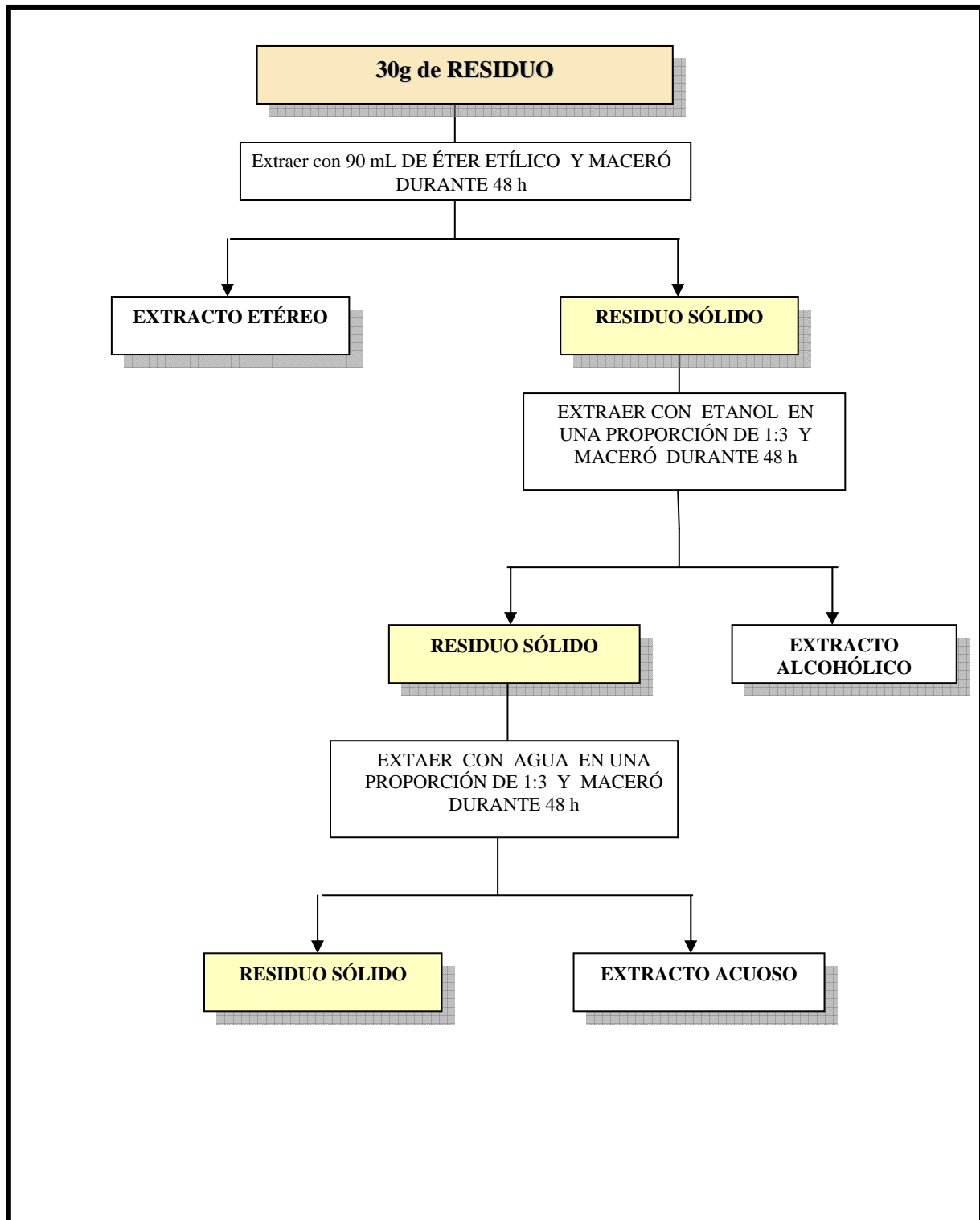


Figura 12. Extracción sucesiva del residuo de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L. para la marcha fitoquímica

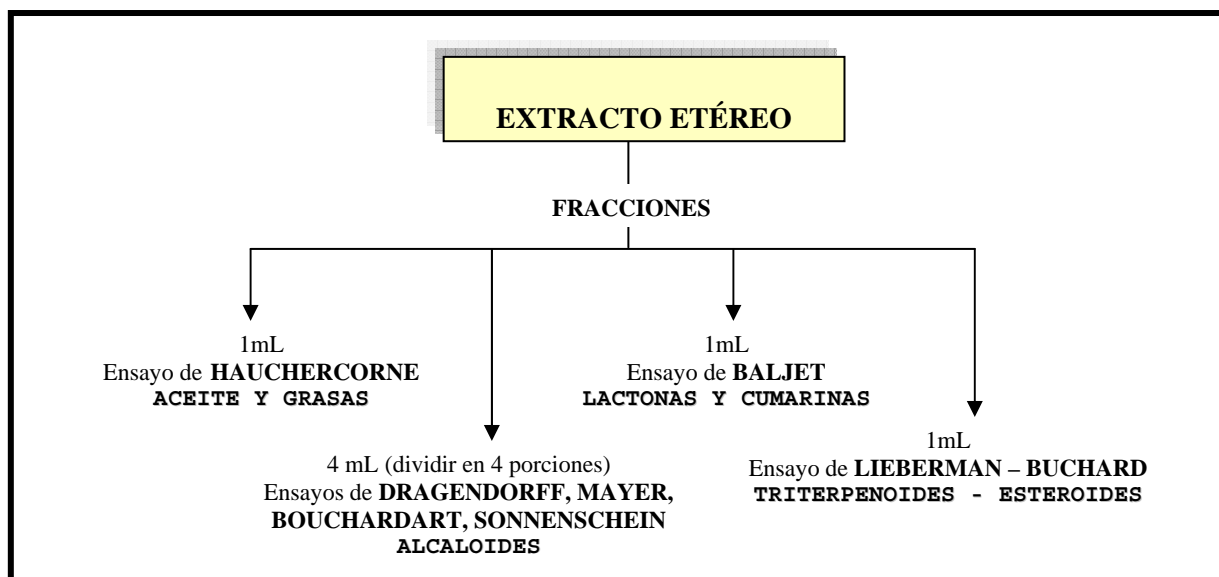


Figura 13. Marcha fitoquímica del extracto etéreo

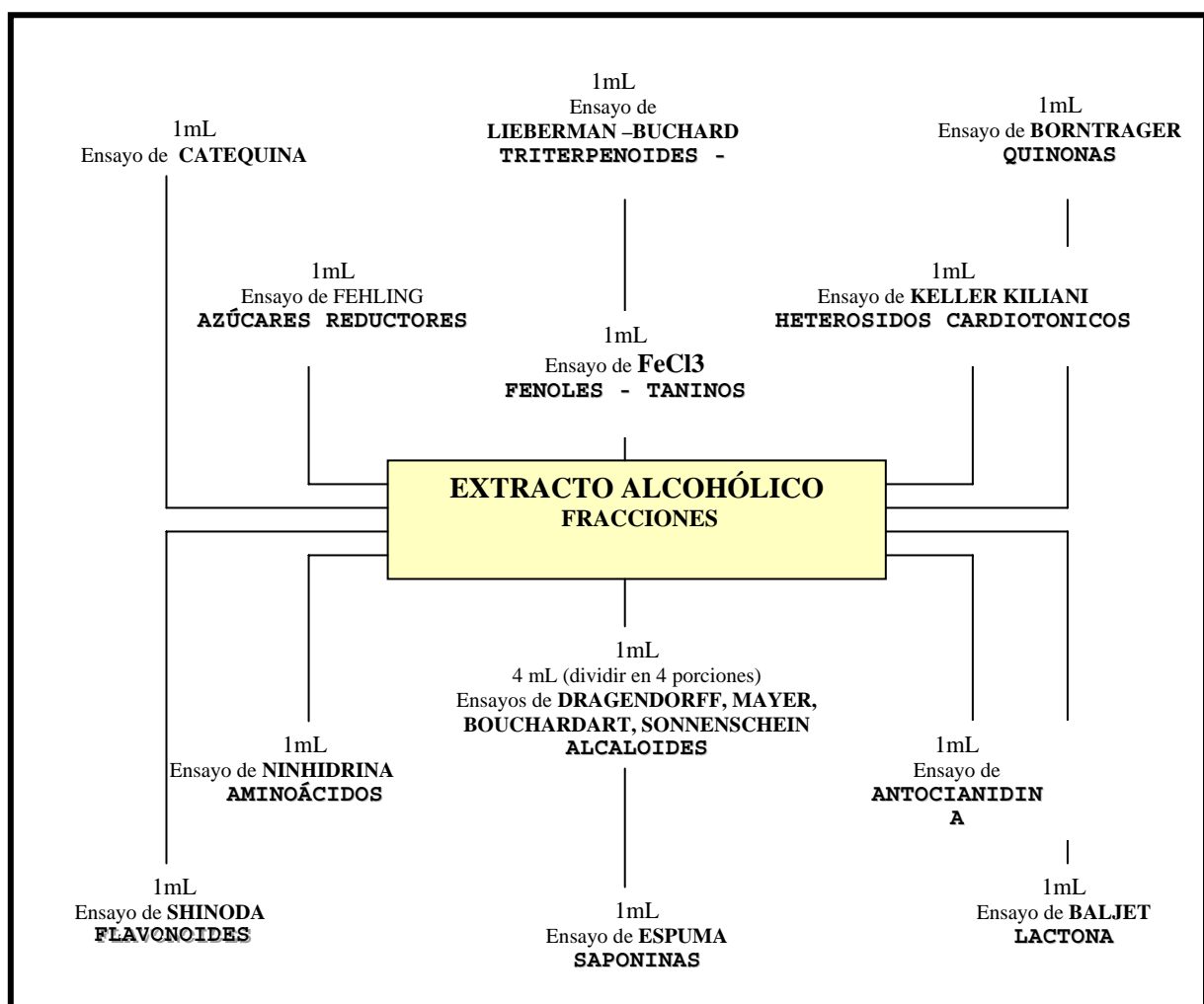


Figura 14. Marcha fitoquímica del extracto alcohólico

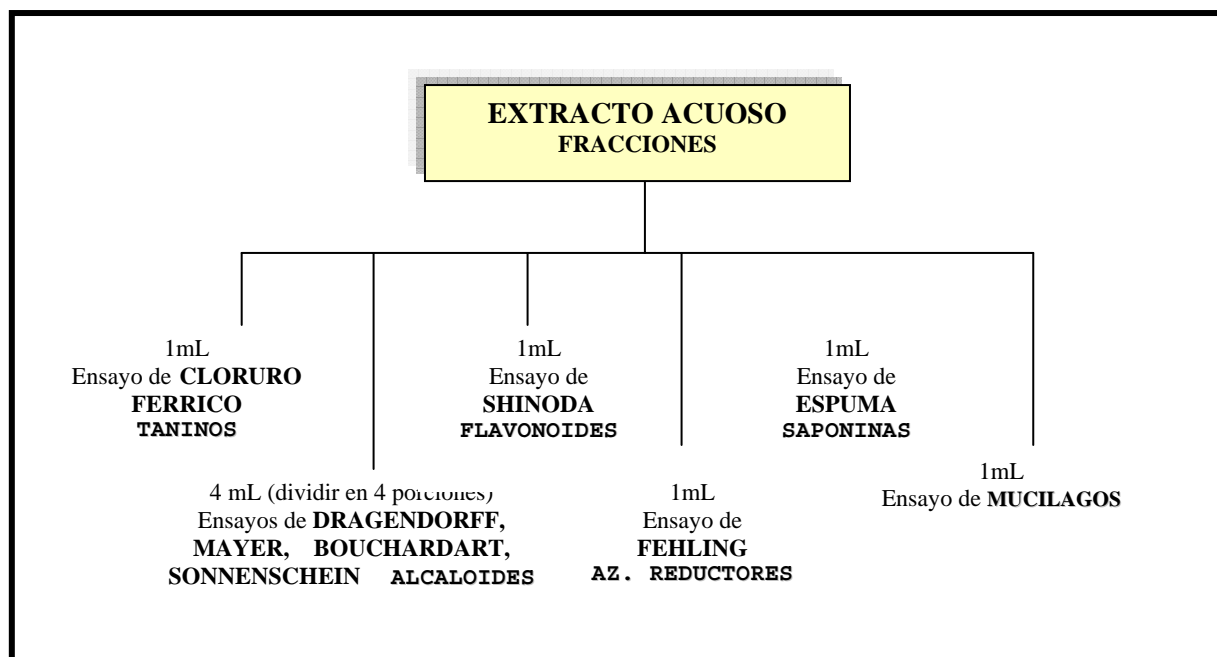


Figura 15. Marcha fitoquímica del extracto acuoso

3.2.2.1.1. Análisis Cromatográfico

Método: Cromatografía en capa fina

Fundamento:

Se fundamenta en los fenómenos físicos de adsorción, siempre hay un soporte sólido microporoso al que se adsorben las sustancias, acumulándose en el extremo superior. Los distintos componentes pueden ser separados haciendo pasar disolvente puro a través del mismo. De este modo, las sustancias retenidas descienden lentamente y se separan más entre sí ⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾.

Procedimiento:

Se utilizó cromatofolios con silicagel 60F ₂₅₄, en el cual se aplica el extracto hidroalcohólico, utilizando capilares nuevos; posteriormente colocados en cámaras de separación cromatográfica, previamente saturada con los sistemas de solventes:

➤ **Para taninos:**

1-Butanol: Ácido Acético: Agua (4:1:5)

➤ **Para saponinas:**

Cloroformo: Acetato de etilo (9:1)

3.2.2.2. Cuantificación de taninos

Método: analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo ⁽⁵¹⁾.

Fundamento:

El método se basa en la reacción de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin (tungstato fosfomolibdico; carbonato de sodio 20%) el cual produce un complejo de color azul, cuya extensión es medida a 700nm, determinándose el contenido total de fenoles.

Posteriormente se utilizó una solución de gelatina al 25% para garantizar el secuestro de los taninos, obteniéndose de la diferencia de ambas determinaciones el porcentaje de taninos reportados como ácido tánico ^(50,51).

3.2.2.2.1. Diseño experimental

El método consta de 2 etapas: la etapa (A) donde se cuantifican los polifenoles totales en el extracto acuoso de los residuos de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L., y la etapa (B) donde se cuantifican los polifenoles residuales después del secuestro de los taninos con gelatina ⁽⁵¹⁾.

➤ **Solución tungstato-fosfomolibdico**

Se disolvió 10 g de tungstato de sodio dihidratado, 0.2 g de ácido fosfomolibdico hidratado y 5.0 mL de ácido fosfórico al 85% en 75 mL de agua desionizada. La solución se reflujo por 2 horas (hasta aparición de color amarillo; no verde, ni azul) y se completó con agua desionizada a 100 mL.

➤ **Ensayo A: cuantificación de polifenoles totales**

Se midió y transfirió 4mL de extracto a un matraz aforado de 250 mL, diluyendo con agua desionizada hasta enrase. De la solución anterior se tomaron porciones de 1, 2, 3, 4 y 5 mL y se llevó a matraces aforados de 25 mL; a cada matraz, se agregó 2 mL de solución tungstato- fosfomolibdico, se agitó y se dejó reposar durante 5 minutos. Luego se añadió 1mL de solución de carbonato de sodio al 20%, se agitó, enrasó con agua desionizada y homogenizó. Se lee la absorbancia de las soluciones a 700nm después de transcurridos 2 minutos de la reacción.

➤ **Ensayo B: cuantificación de polifenoles residuales**

Se midió y transfirió 20 mL del extracto a un matraz aforado de 250 mL con tapa, luego se adicionó 60 mL de agua desionizada, 50 mL de solución de gelatina al 25%, 100 mL de solución saturada de cloruro de sodio acidificado y 10 g de caolín y luego enrasado con agua desionizada. Se tapó y agitó durante 1 hora, posteriormente se filtró.

Del filtrado se tomó y transfirió 10 mL a un matraz aforado de 50 mL completado con agua desionizada. Luego se tomó y llevó 1, 2, 3,4 y 5 mL a matraces aforados de 25 mL; a un matraz, se agregó 2 mL de solución de tungstato- fosfomolibdico, se agitó y se dejó reposar durante 5 minutos. Luego se añadió 1 mL de solución de carbonato de sodio al 20% se agitó, enrasó con agua desionizada y homogenizó. Se leyó la absorbancia de las soluciones a 700 nm después de transcurridos 2 minutos de la reacción.

➤ **Sustancia de referencia**

Se pesó 25 mg de ácido tánico, se transfirió a un matraz aforado de 100 mL y se completó el volumen con agua desionizada. Posteriormente se midió y trasnfirió 20 mL a un matraz aforado de 100 mL enrasando con agua desionizada. De la solución anterior se transfirió 1,2,4,6,8,10 y 12 mL a matraces aforados de 25 mL a cada matraz, se agregó 2 mL de solución tungstato-fosfomolibdico, se agitó y se dejó reposar durante 5 minutos. Luego se añadió 1 mL de solución de carbonato de sodio al 20%, se agitó, enrasó y homogenizó. Se leyó la absorbancia de las soluciones a 700 nm después de transcurridos 2 minutos de la reacción.

➤ **Blanco (Método A)**

Se añadió 1, 2, 3, 4 y 5 mL de agua desionizada a matraces aforados de 25 mL; a cada matraz, se agregó 2 mL de solución tungstato-fosfomolibdico, se agitó y se dejó reposar durante 5 minutos. Luego se añadió 1 mL de solución de carbonato de sodio al 20%, se agitó, enrasó y homogenizó. Se leyó la absorbancia de las soluciones a 700 nm después de transcurridos 2 minutos de la reacción.

➤ **Blanco (Método B)**

Se adicionó 80 mL de agua desionizada, 50 mL de solución de gelatina al 25%, 100 mL de solución saturada de cloruro de sodio acidificada y 10 g de caolín, y enrasó con agua en un matraz aforado de 250 mL con tapa. Se tapó y agitó durante 1 hora, se dejó reposar para posteriormente filtrar. Del filtrado se tomó y se transfirió 10 mL a un matraz aforado de 50 mL, , luego se tomó y llevó 1, 2, 3, 4 y 5 mL a matraces aforados de 25 mL; a cada matraz, se agregó 2 mL de solución tungstato-fosfomolibdico, se agitó y se dejó reposar por 5 minutos, Luego se añadió 1 mL de solución de carbonato de sodio al 20%,se agitó, enrasó y homogenizó. Se leyó la absorbancia de las soluciones a 700 nm después de transcurridos 2 minutos de la reacción

3.2.2.3. Cuantificación de saponinas totales

Método: metodología de cuantificación espectrofotométrica de las saponinas de *pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen Amaranthaceae ⁽⁵²⁾.

Fundamento:

El ácido sulfúrico concentrado produce la hidrólisis de los heterósidos saponínicos, los cuales reaccionaran con el cloruro de cobalto. La reacción da una coloración rosada tenue, cuya extensión es medida a 280nm, determinándose el contenido total de saponinas.

3.2.3. ESTUDIO BROMATOLÓGICO

3.2.3.1. Estudio químico proximal

Se realizó el análisis proximal empleando, las técnicas estandarizadas del Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM (Arbaiza, 1997) ⁽⁵³⁾.

1. Determinación de la humedad

Método : gravimétrico (A.O.A.C. 1997) ⁽⁵⁴⁾

Fundamento : se basa en la pérdida de humedad de la muestra, por volatilización, a causa del calor, cuando es sometida a una temperatura de 60 °C.

2. Determinación de extracto etéreo

Método : Goldsich (A.O.A.C. 1997) ⁽⁵⁴⁾

Fundamento : el éter se evapora y condensa continuamente y al pasar a través de la muestra se extrae los materiales solubles en el solvente orgánico.

3. Fibra

3.1. Determinación de fibra cruda

Método : hidrólisis ácida y básica (A.O.A.C. 1997) ⁽⁵⁴⁾

Fundamento : se basa en la digestión ácida-alcalina por acción del ácido sulfúrico y el hidróxido de sodio diluido a ebullición, para obtener luego de la incineración la fibra cruda.

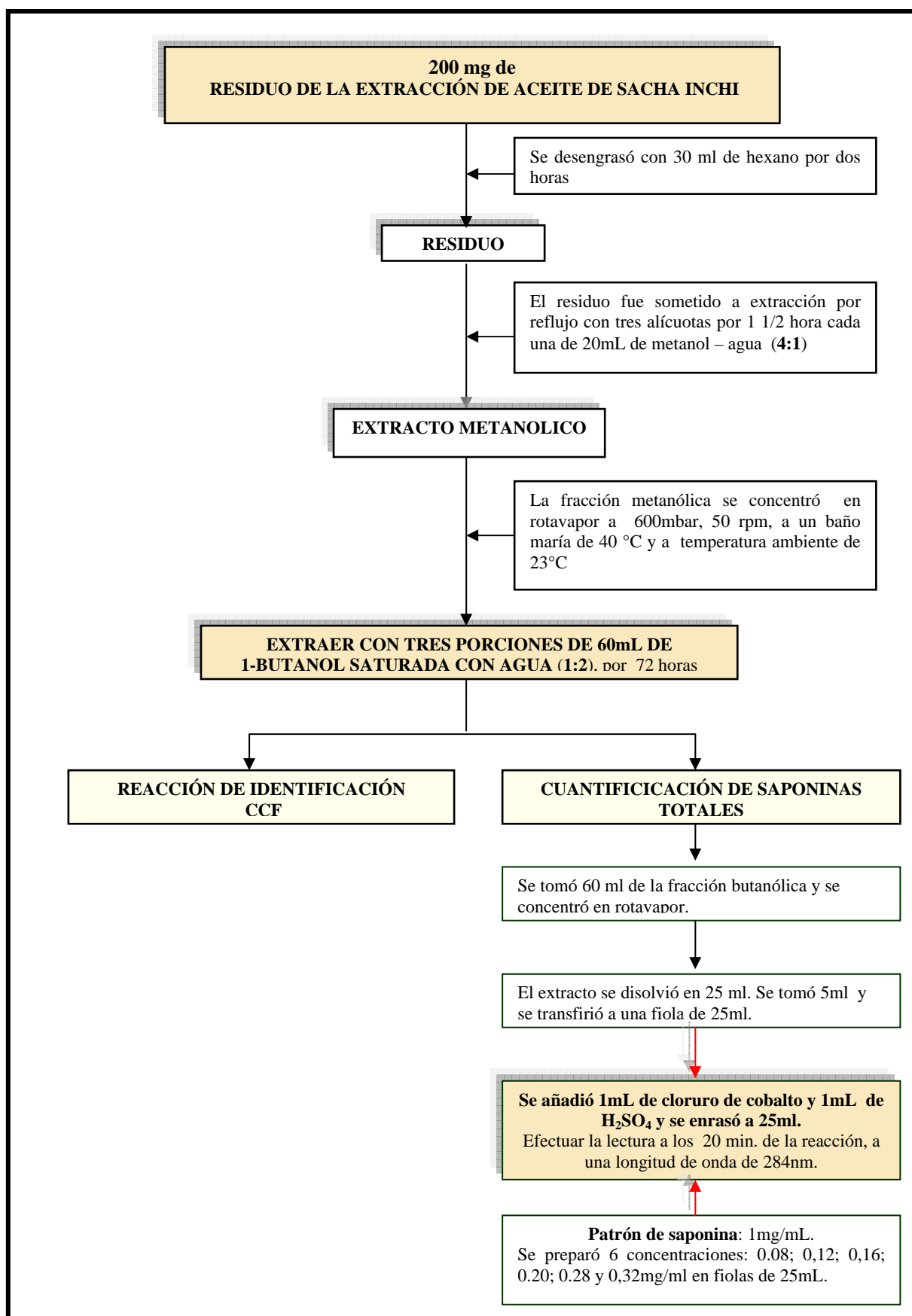


Figura 16. Procedimiento de extracción, identificación y cuantificación de saponinas totales

3.1. Fibra detergente neutro

Método : Van Soest (A.O.A.C. 1997) ⁽⁵⁴⁾

Fundamento : se basa en la ruptura de la pared celular de las células vegetales usando como detergentes la solución de sulfato lauril sódico en un pH neutro.

La porción de muestra de alimento insoluble en un detergente neutro está básicamente compuesta por celulosa, hemicelulosa, lignina y sílice, y se la denomina pared celular. La misma se correlaciona inversamente con el consumo voluntario de materia seca ⁽¹⁸⁾.

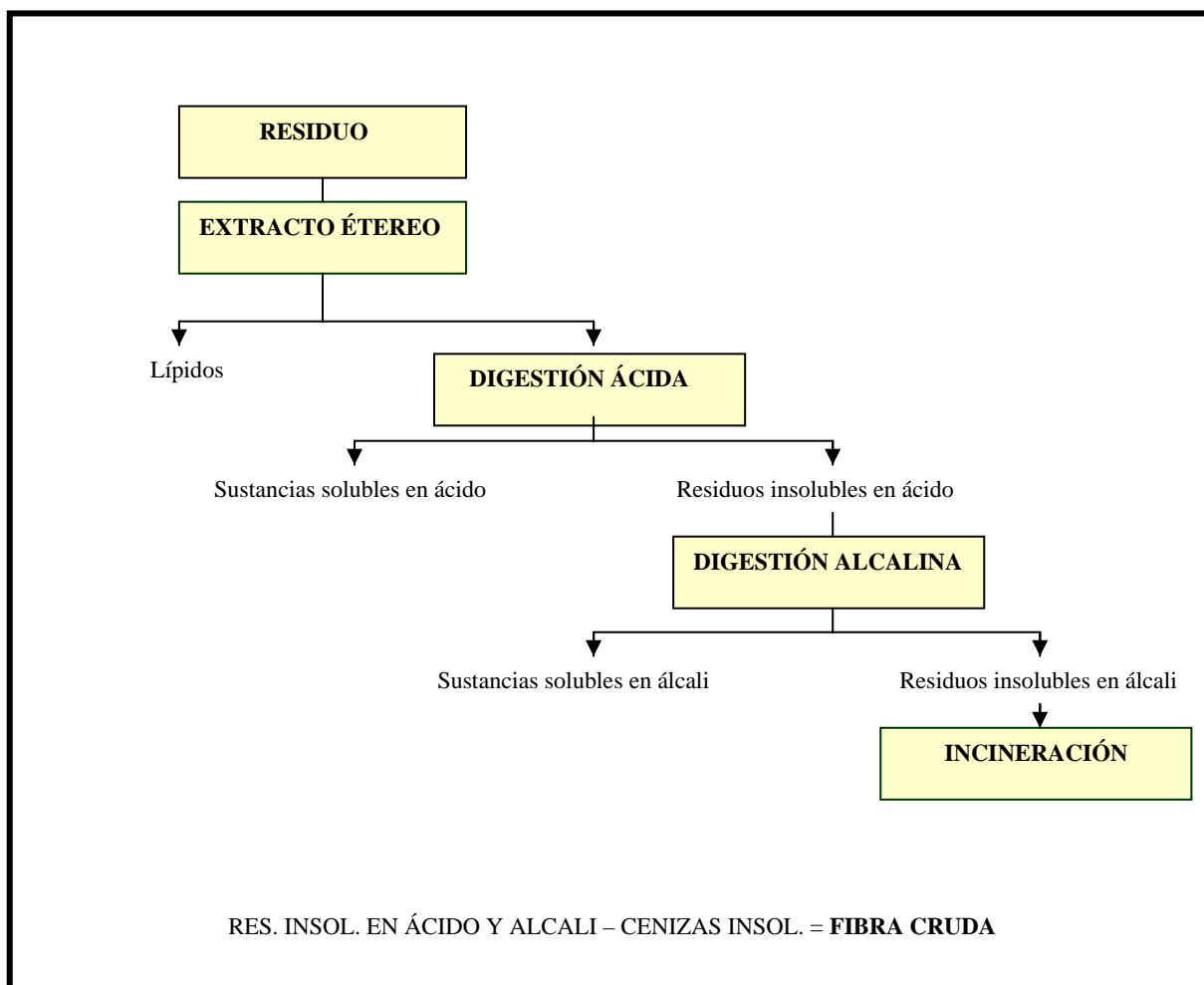


Figura 16. Determinación de fibra cruda

Fuente: Protocolo de Prácticas de Laboratorio de Bioquímica y Nutrición Animal. Teresa Arbaiza Fernández. 2007

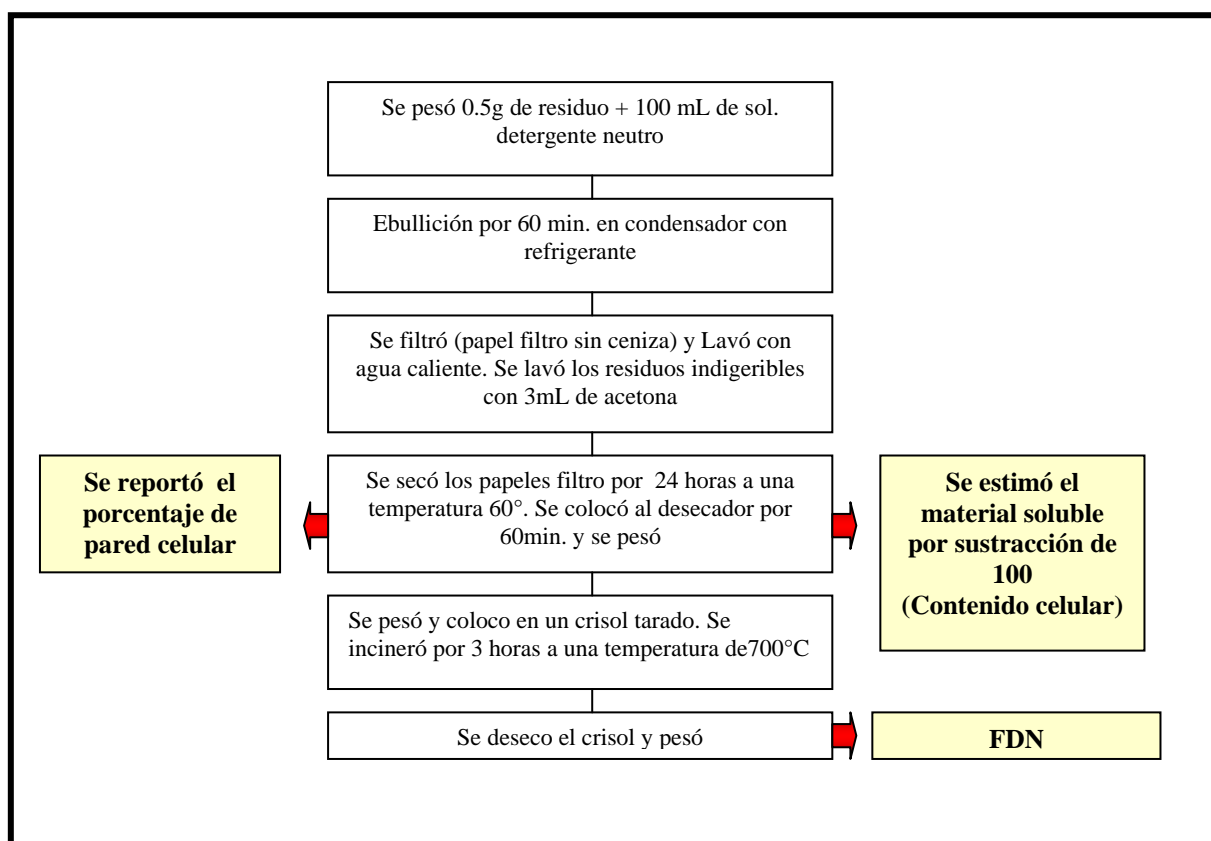


Figura 17. Determinación de fibra detergente neutro

4. Determinación de proteínas

4.1. Nitrógeno total.

Método : Kjeldhal. (A.O.A.C. 1997) ⁽⁵⁴⁾.

Fundamento : se produce la digestión de proteínas con ácido sulfúrico y catalizadores para convertir el nitrógeno orgánico en iones amonio, estos son desplazados por un álcali y receptionado en un ácido de concentración conocida. Se valora el ácido receptionado. El resultado final es el N contenido en la muestra.

5. Determinación de ceniza ⁽⁵⁴⁾

Método : calcinación e incineración simple (A.O.A.C. 1997) ^(54,55).

Fundamento : se produce la oxidación de la materia orgánica mediante carbonización e incineración, dando lugar a la formación de óxidos y sales minerales.

Tabla 12. Composición de los principios inmediatos del análisis de Weende.

ORGÁNICOS	NITROGENADOS	PROTEÍNAS	Aminoácidos no indispensables	Ac. glutámico, alanina, ac. aspártico, serina
			Aminoácidos semiindispensables	Arginina, glicina, histidina, cistina, tirosina, prolina
			Aminoácidos indispensables	Lisina, triptofano, valina, metionina, fenilalanina, treonina, leucina, isoleucina
		NO PROTEÍNAS	Aminas Ácidos nucleicos	
	LÍPIDOS	NEUTROS	Acilglicéridos	Triglicéridos
			Esteróides	Colesterol, Vit D.
			Terpenoides	Caroteno, Vit A
		FOSFOLÍPIDIOS	Fosfoglicéridos	Lecitina
			Esfingolípidos	Esfingomielina
	CARBOHIDRATOS	EXTRACTO LIBRE DE NITRÓGENO	Vitaminas hidrosolubles	Tiamina, riboflavina, niacina, vit. B6, ácido pantoténico, biotina, vit. B12, ácido ascórbico.
			Monosacáridos Polisacáridos (soluble)	Pentosa o hexosas simples, azúcares compuestos, almidones
		FIBRA BRUTA	Polisacáridos (insoluble)	Celulosa Hemicelulosa
INORGÁNICOS	CENIZAS	Elementos MACRO		Ca, Mg, Na, K, P, Cl, S.
		Elementos MICRO		Mn, I, Cu, Fe, Zn, Co, Mo, Se, Cr, Sn, F, Ni, V, Si.
		Elementos POSIBLEMENTE ESENCIALES		As, Ba, Br, Cd, F, Pb, Hg, Sr.
		Elementos POTENCIALMENTE TOXICOS		Cu, Mo, Se, As, Cd, F, Pb, Hg, Si.
		Elementos Esenciales		Al, Sb, Bi, B, Ge, Au, Pb, Hg, Ag, Ti

Fuente: Protocolo de prácticas de Laboratorio de Bioquímica y Nutrición Animal. Teresa Arbaiza Fernández. 2007.

6. Determinación de extracto libre de nitrógeno

Método : Matemático (A.O.A.C. 1997)^(54,55)

Fundamento : Se obtiene por diferencia al restar al total 100% la suma de los 5 macronutrientes restantes (proteínas, fibra cruda, extracto etéreo, cenizas y humedad.).

3.2.3.2. Determinación de minerales y oligoelementos.

La determinación de calcio, hierro fue realizado en CERPER, Certificaciones del Perú S.A.

Método : se realizó mediante el método Absorción Atómica⁽⁵⁶⁾.

Fundamento : se basa en la disociación del elemento de interés en la muestra utilizando lámparas de cátodo hueco, estas lámparas emiten solo el espectro del elemento buscado. La absorción es selectiva y se produce a una determinada longitud de onda, dependiendo únicamente del agente absorbente y siguiendo la Ley de Lambert y Beer.

El procedimiento para la determinación de Calcio y hierro es como sigue a continuación:

3.2.3.2.1. Determinación de calcio

Después de la incineración de la muestra se diluyó con ácido nítrico y ácido clorhídrico, luego se atomizó con flama de óxido nitroso-acetileno y se agregó a cada muestra 200ppm de cloruro de potasio como regulador de ionización. Se midió la absorción a una longitud de onda de 422 nm⁽⁵⁶⁾.

3.2.3.2.2. Determinación de hierro

Para determinar los elementos inorgánicos, entre ellos el hierro, se incineró la muestra en seco y se disolvió en ácido nítrico y ácido clorhídrico. La muestra que contenía hierro en solución se atomizó en una flama de aire-acetileno y se midió la absorción a una longitud de onda de 248 nm⁽⁵⁶⁾.

3.2.3.2.3. Determinación de fósforo

Método : Espectrofotométrico con molibdovanadato (A.O.A.C. 1997) ^(60,61).

Fundamento : se basa en la reducción del molibdovanadato de amonio a fosfomolibdovanadato de amonio obteniéndose un intenso color azul y cuya intensidad es leída a 400nm

3.2.3.3. Determinación de vitaminas

Método : fluorométrico ⁽⁵⁶⁾

Fundamento : el fundamento del método reside en la excitación del átomo por una energía electromagnética, que hace que los e- del átomo la absorban cambiando de capa, y al volver a su lugar, el átomo vuelve a estado de reposo produciendo una energía luminosa. La intensidad de la energía electromagnética que produce la materia es proporcional a la concentración del átomo que medimos.

La determinación de tiamina, riboflavina y niacina fue realizado en la Sociedad de Asesoramiento Técnico S.A.C. (SAT) por el método fluorométrico y la determinación de niacina se realizó por el método colorimétrico.

3.2.3.3.1. Determinación de tiamina

A partir del tiocromo formado por la oxidación de la tiamina con ferricianuro de potasio en solución acuosa de hidróxido de sodio ^(54,56).

3.2.3.3.2. Determinación de riboflavina

La medida total de riboflavina se dió después de la hidrólisis ácida de FMN y FAD; completada con ácido clorhídrico 0.1 N. Las proteínas son removidas a pH 4.5. Para destruir la interferencia de sustancias fluorescentes se acidificó con ácido acético glacial y oxidado con exceso de KMnO_4 al 3%.

Para eliminar el exceso KMnO_4 se añadió H_2O_2 al 3% gota a gota. El KMnO_4 se agregó para asegurar que toda la vitamina presente se encuentre en la forma oxidada fluorescente. La forma oxidada presenta fluorescencia amarillo verdosa con picos máximos de absorción a 220 - 225, 266, 371, 444 y 475 nm. La riboflavina se redujo reversiblemente a leucobase (un dihidro compuesto que no presenta fluorescencia) por el hidrógeno, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ y SnCl_2 , para corregir la fluorescencia que queda después de las permanganato oxidaciones para reducir los pigmentos extraños o sustancias fluorescentes interferentes ^(54,56).

3.2.3.3.3. Determinación de niacina

Método : colorimétrico ⁽⁵⁶⁾.

Fundamento : el anillo piridinico del ácido nicotínico liberado por hidrólisis, se abre con bromuro de cianógeno, el producto de la escisión reacciona con el ácido sulfanílico quien proporciona el colorante amarillo de polimitina. La lectura se realiza a una longitud de onda de 436nm.

3.2.3.4. Digestibilidad de proteínas *in vitro*

Los estudios de digestibilidad demandan tiempo por lo cual se han hecho numerosos intentos para reproducir en el laboratorio las reacciones que tienen lugar en el tracto digestivo del animal, por este motivo, se realizó la digestibilidad de las proteínas mediante las técnicas multienzimáticas, ataque *in vitro* con pepsina y ácido clorhídrico ⁽⁵³⁻⁵⁵⁾.

3.2.3.4.1. Digestibilidad enzimática por pepsina

Método : pepsina y ácido clorhídrico ⁽⁵⁵⁾.

Fundamento : se basa en la propiedad que tienen las proteínas de hidrolizarse y solubilizarse utilizando enzimas proteolíticas en condiciones controladas.

3.2.3.4.2. Digestibilidad enzimática por celulasa

Método : enzimático por celulasa y pepsina ^(53,55).

Fundamento : la solubilidad de la pared celular no lignificada y lignificada moderadamente por acción de la celulasa y remoción de los componentes solubles (contenido celular) con pepsina y ácido clorhídrico.

3.2.3.5. Determinación de aminoácidos por HPLC de fase reversa

Método : Heinrikson, R.L. and Meredith, S.C, modificado por Monteghirfo, M., y Arnao, I. ⁽⁵⁷⁻⁶⁰⁾

Fundamento : la proteína purificada después de someterse a hidrólisis es desecada y derivatizada (reacción química del aminoácido con el fenilisotiocianato). Los feniltiocarbamilaminoácidos formados de la derivatización se separan por HPLC de fase reversa.

Los feniltiocarbamilaminoácidos menos hidrofóbicos se asociaran primariamente con la fase hidrofílica (eluyendo primero), mientras los feniltiocarbamilaminoácido más hidrofóbicos se encontrarán en la fase lipofílica (mayor retención).

3.2.3.5.1. Preparación de los residuos para la determinación de aminoácidos

Se empleó (50 g) residuos de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L. desecados y desengrasados con éter de petróleo en proporción de 1:3 durante 4 horas por un periodo de tres días con ayuda de un agitador magnético a velocidad constante. La muestra desengrasada se tamizó y almacenó en refrigeración.

Para determinar la mejor solubilidad de los residuos desengrasados y tamizados con la finalidad de elegir el solvente que extrajera mejor las proteínas se preparó concentraciones al 20 y 30% en suero fisiológico, agua bidestilada y tris – HCL. Para y se empleó el método de Lowry, por ser un método sencillo para estimar las proteínas totales.

3.2.3.5.2. Determinación de proteínas

Método : Lowry ⁽⁶¹⁾

Fundamento : El principio de este método consiste en la reacción de las proteínas con el reactivo de Folin Ciocalteau que forma un complejo coloreado azul. El color se debe a la reacción del cobre del reactivo en medio alcalino con la proteína y la reducción del fosfomolibdato por la tirosina y el triptófano presentes en la proteína.

3.2.3.5.3. Extracción de proteínas

Método : cromatográfico de exclusión por tamaño o filtración en gel ⁽⁶¹⁾

Fundamento : consiste en la separación de las proteínas en función de su tamaño. Las proteínas mayores se desplazan más rápidamente que las de menor tamaño y siguen una ruta más directa a través de la columna, eluyendo más rápidamente. Las más pequeñas penetran en los poros y son retardadas por la ruta laberíntica que describen a través de la columna.

3.2.3.5.4. Separación de los PICT-aa por HPLC en fase reversa.

Previamente a la separación de los PICT-aa se realizó la hidrólisis de la proteína (figura 20) y la derivatización de los aminoácidos (figura 21) .

La separación de los PICT-aa se realizó en un sistema de HPLC marca “HITACHI”, modelo “La Chrom Elite” que consiste en un sistema de control de “EZChrom-Elite” con tres bombas, se empleó dos solventes (tabla 13) y un detector de longitud fijado a 254nm.

Para la separación se utilizó una columna de fase reversa Octadecilo (C18) “MERCK” de 25 cm de longitud a una temperatura circulante de 52°C y el flujo fue de 1,0mL.min⁻¹.

Tabla 13. Condiciones de separación de los PICT-aa

Solvente		Tiempo	%A	%B
Solvente A	Solvente B			
Acetato de amonio 0.05 M pH 6	Acetato de amonio 0.1 M pH 6 en acetonitrilo, metanol y agua (44:10:46)	0	100	0
		15	85	15
		30	50	50
		34	0	100
		37	0	100
		40	100	0
		50	100	0
Detector de longitud de onda de 254 nm.				
Temperatura 52°C				
Flujo 1 mL /min				

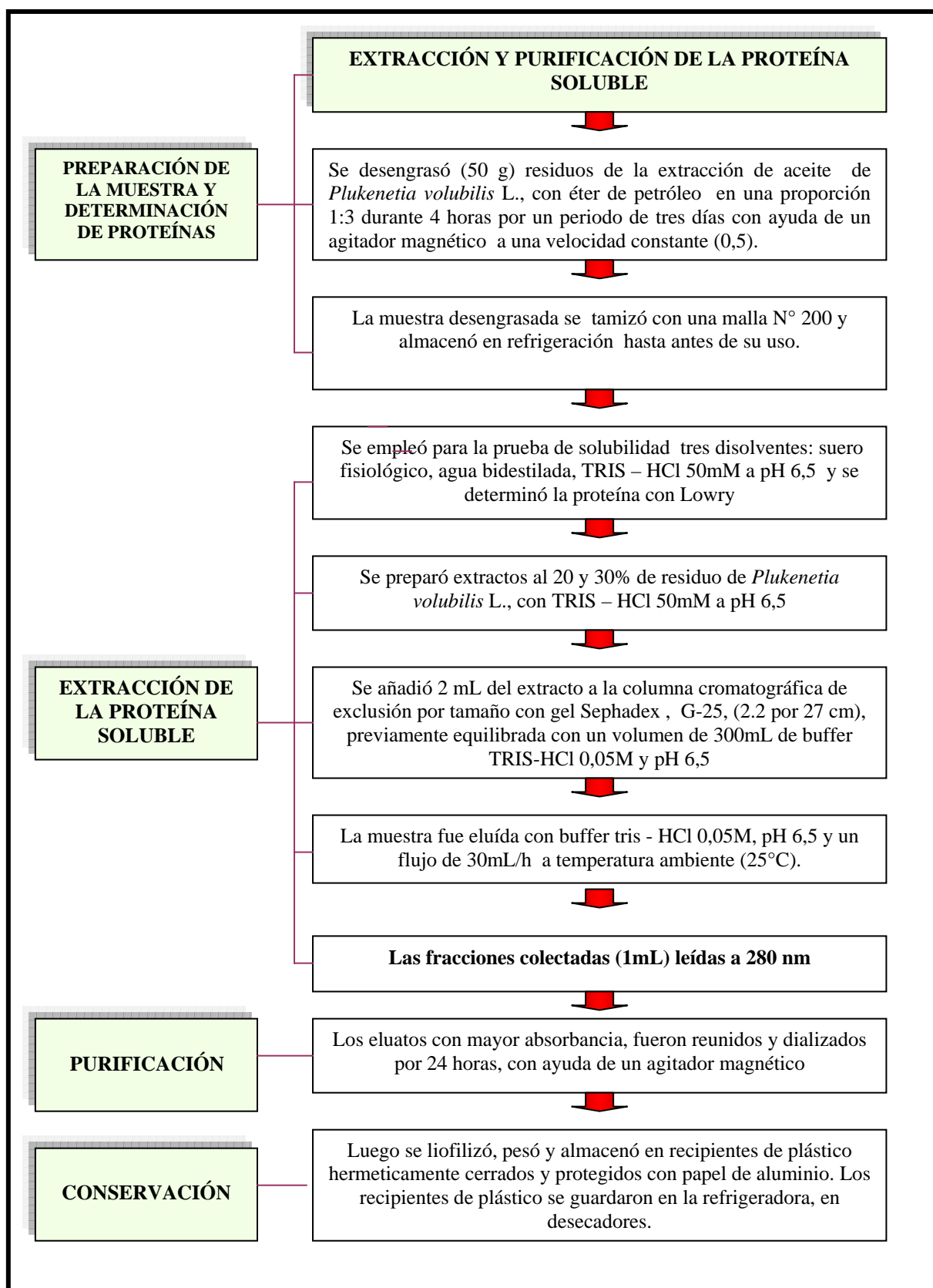


Figura 18. Diagrama de flujo del procedimiento de extracción y purificación de proteína soluble de residuos industriales de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L. “(sacha inchi)”

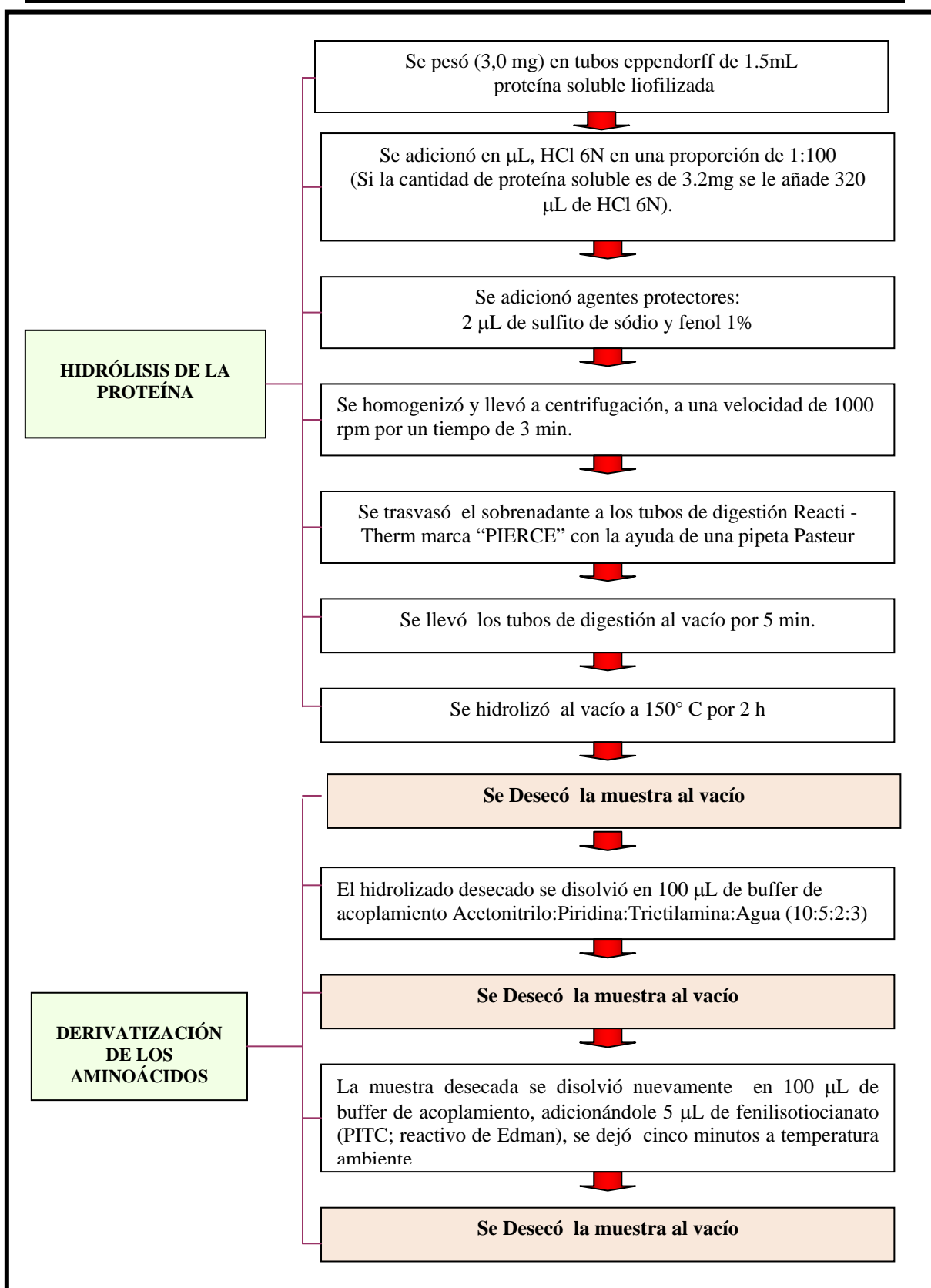


Figura 19. Diagrama de flujo del procedimiento de hidrólisis de la proteína soluble y derivatización de los aminoácidos de residuos de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L.

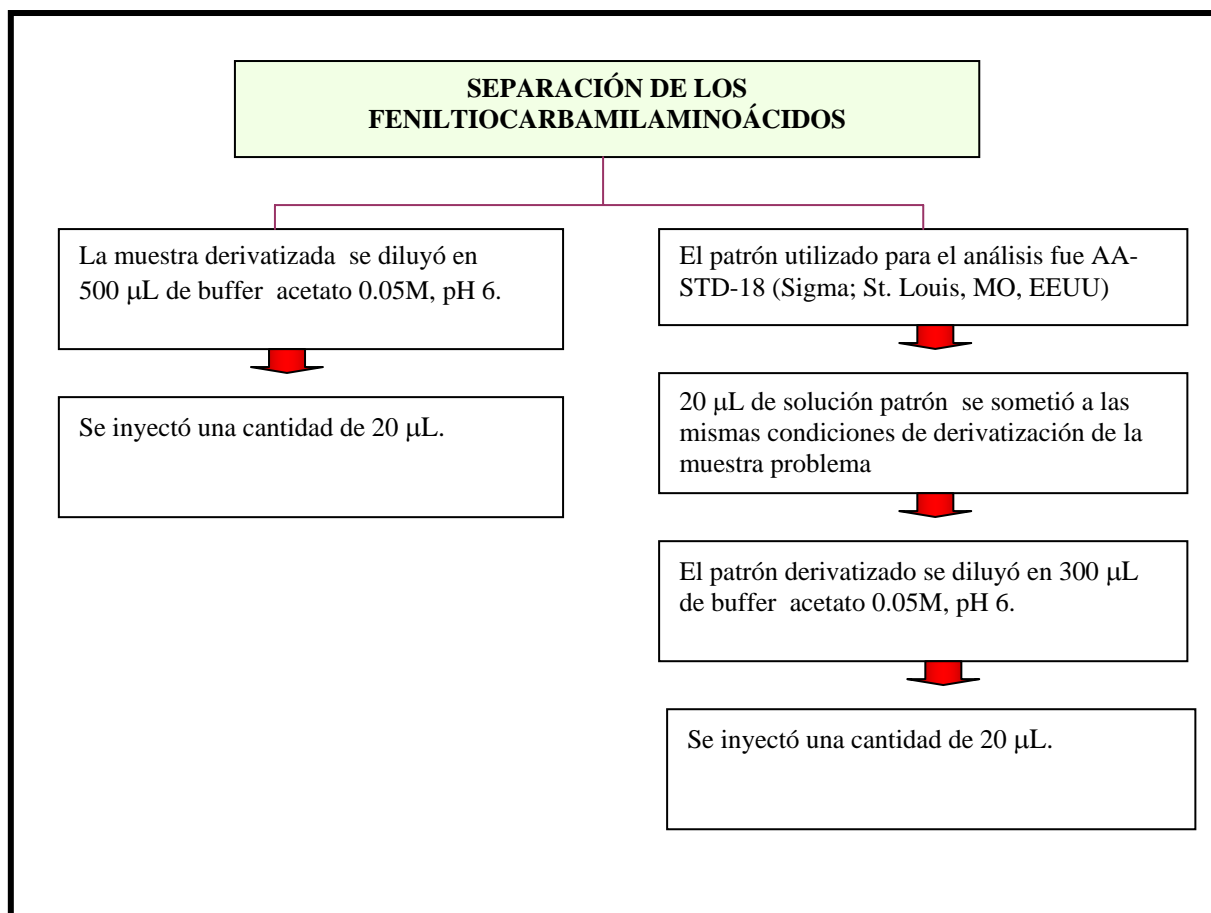


Figura 20. Procedimiento de separación de los feniltiocarbamilaminoácidos de los residuos industriales de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L.

3.2.4. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA A DOSIS LIMITE

Método : procedimiento a Dosis Fijas, internacionalmente validado, aceptado y adoptado en la Guía N° 420 de la OECD y modificado por Betancourt^(62, 64).

Fundamento : Esta basado en un estudio cuali-cuantitativo de los fenómenos tóxicos y de su aparición en función del tiempo tras la administración de una dosis única de la sustancia o de varias dosis fraccionadas en el transcurso de 24 horas.

3.2.4.1. Preparación de la muestra para el ensayo de toxicidad a dosis limite.

Se utilizó el extracto acuoso del residuo industrial de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L. a una concentración de 200mg/mL.

3.2.4.2. Modelo biológico

Se utilizaron 20 ratas albinas Sprague Dawley, de ambos sexos con una masa corporal de 200 ± 20 g y edad de $7,5 \pm 0,5$ semanas. Los animales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, a una temperatura de 20 ± 2 ° C, con humedad relativa de 70 y 80 % y ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas. Recibieron como alimento dieta balanceada, y agua apta para consumo humano. El acceso a los alimentos y el agua fue *ad libitum*. Los animales fueron sometidos a cuarentena e inspección clínica durante una semana antes del inicio del experimento, evitando el estrés⁽⁶⁴⁾.

3.2.4.3. Diseño experimental

Aleatoriamente se conformó cuatro grupos experimentales, dos grupos tratados (01 grupo de machos y 01 grupo de hembras). La muestra fue administrada con ayuno previo de 24 horas por vía oral mediante cánula intragástrica, a dosis única de 2000mg/kg. de masa corporal, teniendo en cuenta la ausencia de signos o síntomas de toxicidad por esta vía de administración. Se dosificó y administró al peso de cada rata un volumen de 2 mL de extracto acuoso y 2 mL de suero fisiológico para los grupos controles⁽⁶⁴⁾.

Los animales fueron observados individualmente durante 30 minutos, con especial atención durante las primeras 24 horas y diariamente hasta los 14 días del experimento. Las observaciones estuvieron dirigidas a la determinación de: muerte y tiempo de ocurrencia de la misma, signos de toxicidad incluyendo su comienzo y duración, además de cambios en la piel, membranas de mucosas y ojos, en el sistema respiratorio, en el nervioso central, en la actividad somatomotora y en la conducta y prestó especial atención a la ocurrencia de convulsiones, salivación, diarrea, letargo, somnolencia y coma⁽⁶⁴⁾.

IV. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO FARMACOGNÓSTICO

Para obtener información de sus constituyentes químicos se realizó la marcha fitoquímica de los residuos industriales de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L., “sacha inchi” que presentó los siguientes constituyentes químicos que se indican en la tablas 16, 17,18 y 19.

4.1.1. Ensayo Organoléptico

Tabla 14. Ensayo organoléptico

Característica	Resultado
Aspecto	Polvo heterogéneo
Color	crema
Olor	Sui generis
Sabor	Amargo, astringente

4.1.2. Análisis cualitativo

Tabla 15. Rendimiento y determinación de sustancias solubles

	Etéreo (1mL)	Alcohólico (1mL)	Acuoso (1mL)
Peso inicial (droga)	0,34g	0,34g	0,34g
Peso final (droga)	0,12g	0,06g	0,06g
Rendimiento	35%	17%	17%

Tabla 16. Resultado de la marcha fitoquímica del extracto etéreo

Constituyentes químicos	Reactivo	Precipitado	Color
Aceite y grasas	Hauchercorne	+++	pardo
Carotenoides	Carr-Price	++	Azul fugaz
Alcaloides	Dragendorf	-	pp. anaranjado
	Mayer	-	pp. blanco
	Bouchardat	-	pp. blanco
Cumarinas	Baljet	-	pp.rojo
Triterpenoides y esteroides	Lieberman- Burchard	+++	rosado
Antraquinonas	Borntrager	-	Rosada/roja

Tabla 17. Resultado de la marcha fitoquímica del extracto alcohólico

Constituyentes químicos		Reactivo	Precipitado	Color
Azúcares reductores		Fehling	+++	pp.rojo ladrillo
Triterpenoides y esteroides		Lieberman- Burchard	+++	Rosado/azul
Aminogrupos libres		Ninhidrina 2%	+++	Azul
Alcaloides		Dragendorf	-	pp. anaranjado
		Mayer	-	pp. blanco
		Bouchardat	-	pp. blanco
Flavonoides		Shinoda	-	Naranja/rojo
Cumarinas		Baljet	-	pp. rojo
Glucosidos		Molish	+++	Anillo violeta
Saponinas	Triterpenoides	Lieberman- Burchard	+++	Rosado
	Esteroides		-	Verde/azul
		Espuma	+++	>2mm x2 min.
Antraquinonas		Borntrager	-	Rosada/roja
Glicósidos cianogenéticos		Papel picrosado	-	Rojo

Tabla 18. Resultado de la marcha fitoquímica del extracto acuoso

Constituyentes químicos		Reactivo	Precipitado	Color
Azúcares reductores		Fehling	+++	pp.rojo ladrillo
Triterpenoides y esteroides		Lieberman- Burchard	+++	Rosado/azul
Aminogrupos libres		Ninhidrina 2%	+++	Azul
Alcaloides		Dragendorf	-	pp. anaranjado
		Mayer	-	pp. blanco
		Bouchardat	-	pp. blanco
Flavonoides		Shinoda	-	Naranja/rojo
Cumarinas		Baljet	-	pp. rojo
Glicósidos		Molish	+++	Anillo violeta
Saponinas	Triterpenoides	Lieberman- Burchard	+++	Rosado /azul
	Esteroides		+++	>2mm x2 min.
Antraquinonas		Borntrager	-	Rojo cereza
Glicósidos cianogenéticos		Papel picrosado	-	rojo
Taninos		Cloruro ferrico 5%	+	Azul/verde
		Acetato de plomo 5%	+	blanco
		Hipoclorito e sodio	-	Anaranjada
		Cianuro de potasio	-	pp. amarillo

Tabla 19. Resultados de la determinación de carbohidratos

Reacción	Reactivo	Resultado	Característica
Reacciones generales	Molish	+++	violeta
Reacciones de azúcares reductores	Fehling	+++	rojo ladrillo
Reacción aldosas	Pelouze	+++	Amarillo naranja
Reacción cetosas	Selivanoff	+++	rosado

Leyenda:

(+++)	: Abundante
(++)	: Moderado
(+)	: Escaso
(-)	: Negativo

4.1.3. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE TANINOS Y SAPONINAS TOTALES

4.1.3.1. Cuantificación de taninos

La curva de calibración del ácido tánico en el rango de concentraciones estudiadas responde a la ecuación $y = 0,0475X + 0,0205$, un coeficiente de correlación 0,9973 y a un intervalo de confianza 95%. Al realizar la significación estadística de la varianza de la pendiente (Tabla ANOVA para la regresión lineal simple, mediante el análisis de regresión). El $F_c(1816,03) > F(1,34)$ por lo tanto se rechazó la hipótesis $H_0 (\beta=0)$ por lo que x e y están relacionadas linealmente. La utilización de la ecuación de regresión para la predicción y estimación es aconsejable.

De acuerdo al valor del coeficiente de correlación lineal simple, se puede afirmar que la variable X (ppm) se encuentran asociadas en forma directa de una manera muy fuerte con la variable dependiente Y (absorbancia), en un 99%. La prueba de hipótesis para la correlación a un nivel de significancia de $\alpha=0,05$, $t_c(42,61) > t(2,57)$, entonces se rechaza la hipótesis $H_0: \rho=0$; con lo que se afirma la correlación.

De acuerdo al coeficiente de determinación R^2 , se puede afirmar que el 99% de las absorbancias se explican por las concentraciones ppm del ácido.

Tabla 20. Curva de calibración de ácido tánico $f(x/y)$

N°	X	Y	$f(X/Y)$
	[Estándar] ppm	Absorbancia	
1	1	0,058	0,058
2	2	0,112	0,056
3	4	0,221	0,055
4	6	0,307	0,051
5	8	0,410	0,051
6	10	0,504	0,050
7	12	0,575	0,048

Tabla 21. Estadísticas de la regresión del ácido tánico

Coefficiente de correlación	0,998
Coefficiente de determinación R^2	0,997
R^2 ajustado	0,997
Error típico	0,011
Observaciones	7

Tabla 22. Análisis de varianza del ácido tánico

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0,227830438	0,22783044	1816,03	1,34
Residuos	5	0,000627276	0,00012546		
Total	6	0,228457714			

Tabla 23. Porcentaje de ácido tánico en el residuo de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L.

N°	Absorbancia			µg/mL	Gramos de droga para 1mL de solución	Porcentaje Taninos
	Polifenoles					
	Totales (T)	Residuales (R)	(T) - (R)			
1	0,0728	0,0522	0,0206	0,0001	8x10 ⁻⁴	1,3 x 10 ⁻⁵
2	0,0726	0,0520	0,0206	0,0001	8x10 ⁻⁴	1,3 x 10 ⁻⁵
3	0,0730	0,0524	0,0206	0,0001	8x10 ⁻⁴	1,3 x 10 ⁻⁵
PROMEDIO						1,3 x 10 ⁻⁵

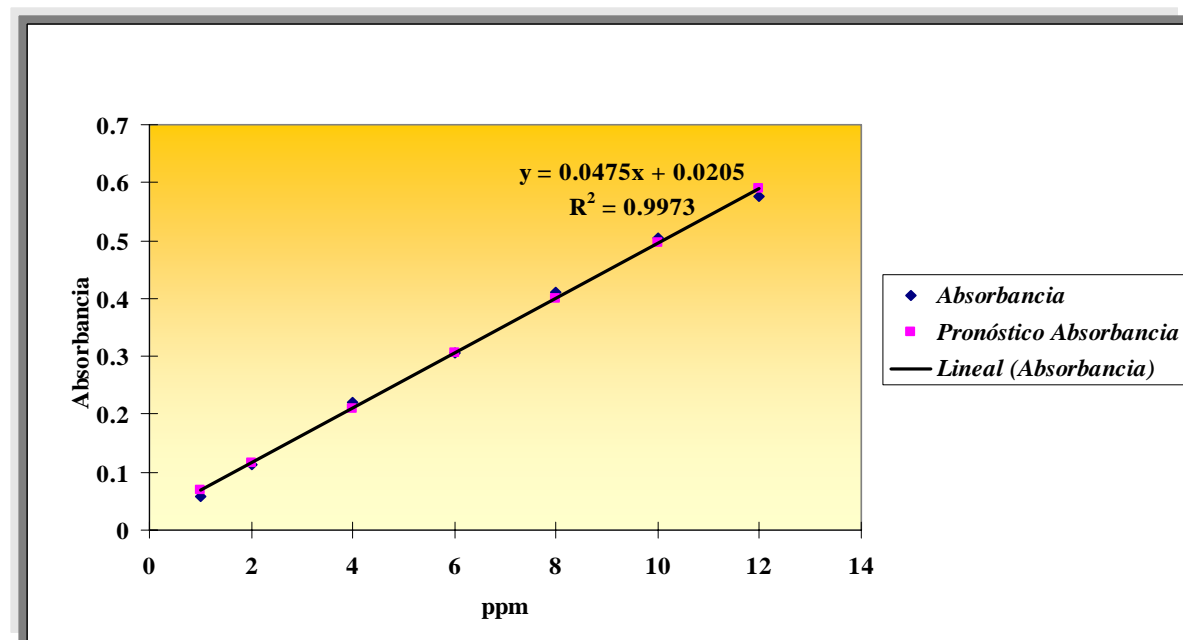


Figura 21. Recta de regresión del ácido tánico

4.1.3.2. Cuantificación de saponinas totales

La curva de calibración de saponina estándar en el rango de concentración estudiadas responde a la ecuación $Y = 1,9582X + 0,3836$ y coeficiente de correlación 0,9513 y a un intervalo de confianza 95%. Al realizar la significación estadística de la varianza de la pendiente (Tabla ANOVA para la regresión lineal simple, mediante el análisis de regresión utilizando Excel 2007, Microsoft office). El $F_c (78,076021) > F_o (0,00090555)$, se rechazó la hipótesis $H_o(\beta=0)$ por lo que X e Y están relacionadas linealmente. La utilización de la ecuación de regresión para la predicción y estimación es aconsejable.

De acuerdo al valor del coeficiente de correlación lineal simple, se puede afirmar que la variable X (mg/mL) se encuentran asociadas en forma directa de una manera muy fuerte con la variable dependiente Y (absorbancia) en un 97,5%. La prueba de hipótesis para la correlación a un nivel de significancia de $\alpha=0,05$, $t_c (8,84) > t_o (2,77)$, entonces se rechaza la hipótesis $H_o:\rho=0$; con lo que se afirma la correlación. De acuerdo al coeficiente de determinación R^2 , se puede afirmar que el 95% de las absorbancias se explican por la regresión.

Tabla 24. Curva de calibración de saponina estándar

N°	X	Y	$f(X/Y)$
	[Estándar] mg/mL	Absorbancia	
1	0,12	0,462	0,500
2	0,16	0,540	0,533
3	0,20	0,608	0,526
4	0,24	0,663	0,560
5	0,28	0,848	0,600
6	0,32	0,904	0,625

Tabla 25. Estadística de la regresión de la saponina estándar

Coefficiente de correlación múltiple	0,975
Coefficiente de determinación R²	0,951
R² ajustado	0,939
Error típico	0,043
Observaciones	6

Tabla 26. Análisis de varianza de la saponina estándar

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	0,14315852	0,14315852	78,076021	0,000906
Residuos	4	0,00733431	0,00183358		
Total	5	0,15049283			

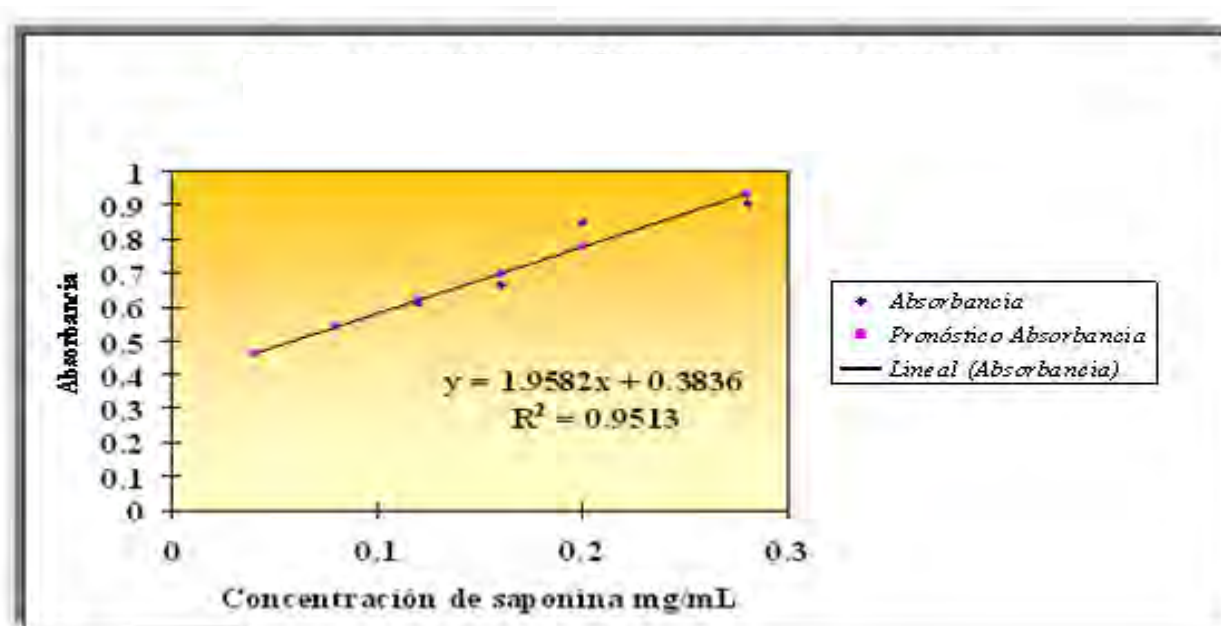


Figura 22. Recta de regresión de la saponina estándar

Tabla 27. Porcentaje de saponinas totales de residuos de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L.

N°	Absorbancia	mg/mL	Gramos de residuo para 1mL de solución	Porcentaje de saponinas Totales
1	0,464	0,041	0,01	0,410
2	0,470	0,044	0,01	0,440
3	0,466	0,042	0,01	0,420
PROMEDIO				0.423

4.1.4. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

4.1.4.1. Taninos



I. *Krameria triandra*

$R_{f_{St 1}}$:0.90

II. *Plukenetia volubilis* L.

Fase estacionaria: Silica Gel 60F₂₅₄

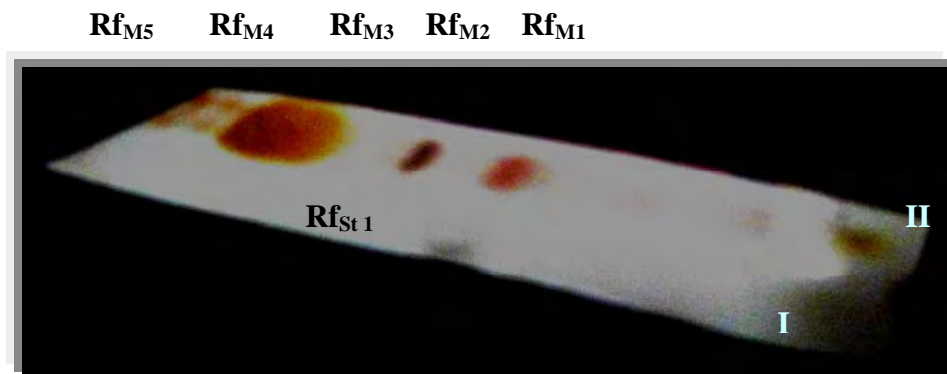
Fase móvil: 1-Butanol: Ac. Acético: Agua (4:1:5)

Revelador: Cloruro Ferrico

Fotografía N° 1. Cromatografía en capa fina de taninos

4.1.4.2. Saponinas

Fase estacionaria : Silica Gel 60F₂₅₄
 Fase móvil : Cloroformo: Acetato de etilo (9:1)
 Revelador : Lieberman - Burchard



Fotografía N°2. Cromatografía de saponinas triterpenoides

I. *Quillaja saponaria*

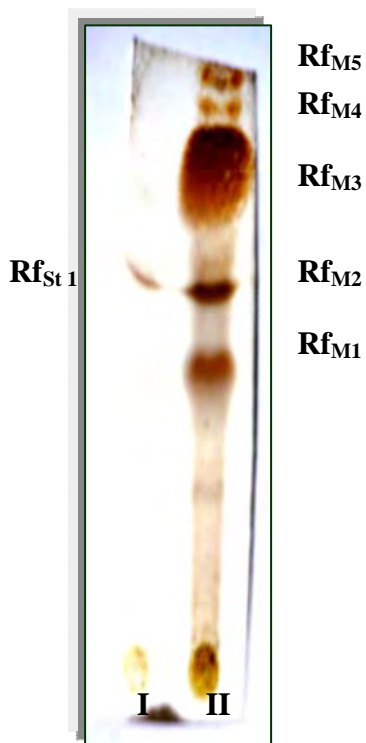
Rf_{St 1}:0.60

II. *Plukenetia volubilis* L.

Rf_{M1}:0.46 Rf_{M2}:0.62

Rf_{M3}: 0.82 Rf_{M4}:0.94

Rf_{M5}:100



I. *Quillaja saponaria*

Rf_{St 1}:0.60

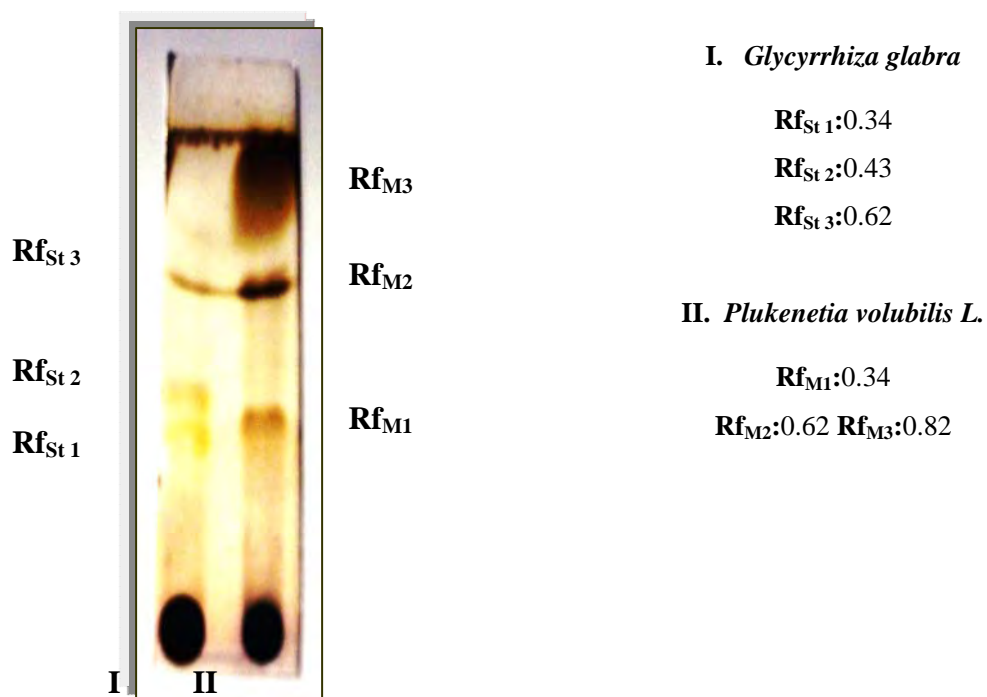
II. *Plukenetia volubilis* L.

Rf_{M1}:0.31 Rf_{M2}:0.46

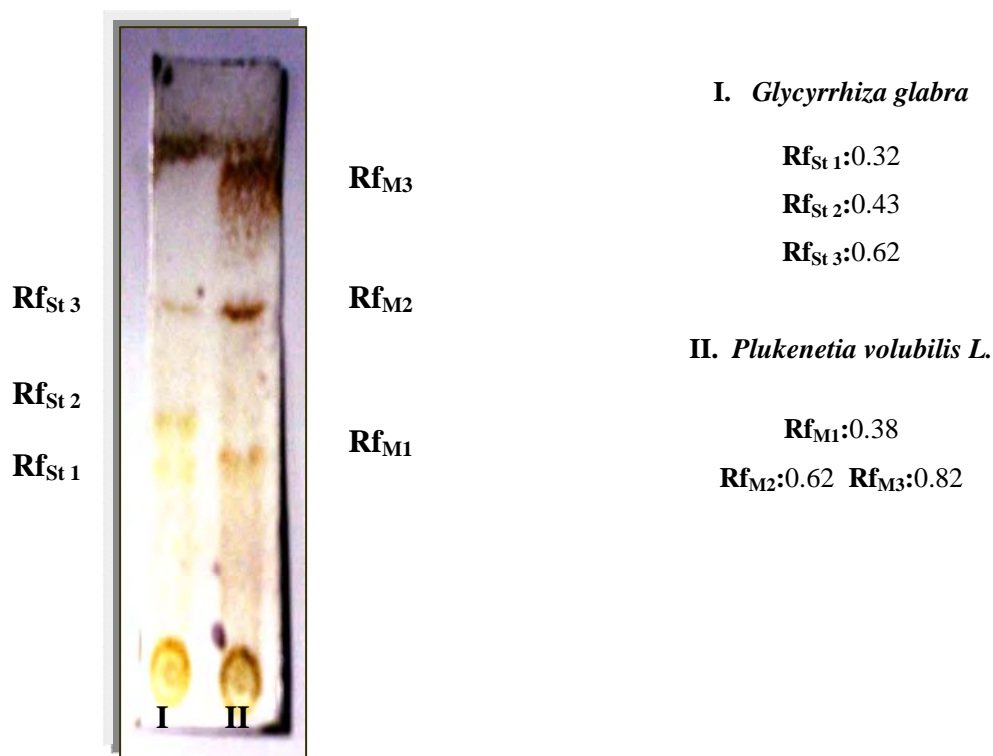
Rf_{M3}: 0.62 Rf_{M4}: 0.82

Rf_{M5}:0.94 Rf_{M6}:100

Fotografía N° 3.cromatografía de saponinas triterpenoides



Fotografía N° 4. Cromatografía de saponinas triterpenoides



Fotografía N° 5. Cromatografía de saponinas triterpenoides

4.2. ESTUDIO BROMATOLÓGICO

4.2.1. ANÁLISIS QUÍMICO PROXIMAL

Para obtener información del contenido de humedad, grasa, proteína y cenizas, se realizó el análisis proximal. Estos procedimientos químicos revelaron el valor nutritivo de los residuos industriales de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L., “sacha inchi” y de esta manera nos da una referencia de cómo pueden ser combinados con otras materias primas para alcanzar el nivel deseado de los diferentes componentes de una dieta (tabla N° 28 a la N° 34).

Tabla 28. Determinación de la humedad

Muestra	Porcentaje de base húmeda	Porcentaje de base seca
A	5,13	94,87
B	5,05	94,95
$\bar{X} \pm S$	5,09±0,057	94,91±0,057

Tabla 29. Determinación de proteínas

Muestra	Porcentaje de base húmeda	Porcentaje de base seca
A	32,51	34,25
B	32,42	34,15
C	32,65	34,39
$\bar{X} \pm S$	32,53±0,12	34,26±0,012

Tabla 30. Determinación de proteínas en muestra de residuos desengrasados

Muestra	Porcentaje de base húmeda	Porcentaje de base seca
A	48,74	51,36
B	50,08	52,77
C	47,41	49,95
$\bar{X} \pm S$	48,74±1,34	51,36±1,41

Tabla 31. Determinación de extracto etéreo

Muestra	Porcentaje de base húmeda	Porcentaje de base seca
A	37,37	39,36
B	33,51	35,30
$\bar{X} \pm S$	35,44±2,73	37,33±2,87

Tabla 32. Determinación de fibra cruda

Muestra	Porcentaje de base húmeda	Porcentaje de base seca
A	3,73	3,93
B	2,28	2,40
$\bar{X} \pm S$	3.00±1,03	3.16±1.08

Tabla 33. Determinación de cenizas

Muestra	Porcentaje de base húmeda	Porcentaje de base seca
A	2,84	3,00
B	3,29	3,47
$\bar{x} \pm S$	3,07±0,32	3,24±0,33

Tabla 34. Análisis proximal de los residuos industriales de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L.

	Porcentaje de base húmeda	Porcentaje de base seca
Humedad	5,09	94,91
Proteína	32,53	34,26
Extracto etéreo	35,44	37,33
Fibra cruda	3,00	3,16
Cenizas	3,07	3,24
Extracto no nitrogenado	20,87	22,01

4.2.2. FIBRA DETERGENTE NEUTRO(FDN)

Tabla 35. Determinación de pared celular y contenido celular

Muestra	Porcentaje de pared celular	Porcentaje de contenido celular
A	23,86	76,14
B	27,46	72,54
$\bar{X} \pm S$	25,66±2,55	74,34±2,55

Tabla 36. Determinación de FDN

Muestra	Porcentaje de FDN
A	16,39
B	16,26
$\bar{X} \pm S$	16,33±2,74

Tabla 37. Resultados de la determinación de fibra detergente neutro

	Porcentaje de base húmeda	Porcentaje de base seca
Pared celular	24,35	25,66
Contenido celular	70,56	74,34
FDN	15,49	16,33

4.2.3. MINERALES ESENCIALES

Tabla 38. Determinación de calcio, fósforo y hierro

Macroelementos		Microelementos
> 100 mg/día		< 100 mg/día
Calcio	Fósforo	Hierro
mg/100g	mg/100g	mg/100g
317,83	560,00	4,18

4.2.4. VITAMINAS

Tabla 39. Determinación de tiamina, riboflavina, niacina

Tiamina	Riboflavina	Niacina
mg/100g	mg/100g	mg/100g
0,31	No detectable	No detectable

Tabla 40. Resultados de la determinación de minerales y vitaminas

	Porcentaje de base húmeda	Porcentaje de base seca
Calcio	301,65	317,83
Fósforo	531,50	560,00
Hierro	3,97	4,18
Tiamina	0,29	0,31
Riboflavina	No detectable	No detectable
Niacina	No detectable	No detectable

4.2.5. pH

Tabla 41. Resultados de la determinación de pH

	Temperatura	pH
pH	23,2	5,89

4.2.6. ACIDEZ TOTAL

Tabla 42. Resultados de la determinación de acidez titulable total

ACIDEZ TOTAL	Porcentaje de base húmeda	Porcentaje de base seca
	1.10×10^{-3}	1.20×10^{-3}
	2.14×10^{-3}	2.26×10^{-3}

Tabla 43. Tabla comparativa del análisis proximal de residuos obtenidos de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L., respecto a *Glycine max* L. y *Chenopodium quinoa* W.

	<i>Plukenetia volubilis</i> L. “RESIDUO” SACHA INCHI	<i>Glycine max</i> “EXPELLER” SOYA ¹	<i>Chenopodium quinoa</i> W “GRANO” QUINUA ²
Humedad	5,09	5,00 – 11,00	7,83
Proteína	34,26	30,00 – 42,00	15,25
Extracto etéreo	35,44	13,2 – 22,5	7,49
Fibra cruda	3,00	4,70 – 6,48	5,09
Cenizas	3,07	4,61 – 5,37	3,54
ELN	20,87	30,9 – 34,00	68,79
Pared Celular	24,35	12,00 – 29,50	54,63

Fuente: ¹Gallardo, M et al. (2008)
² Collazos et al (1996). Tablas Peruanas de Composición de Alimentos.

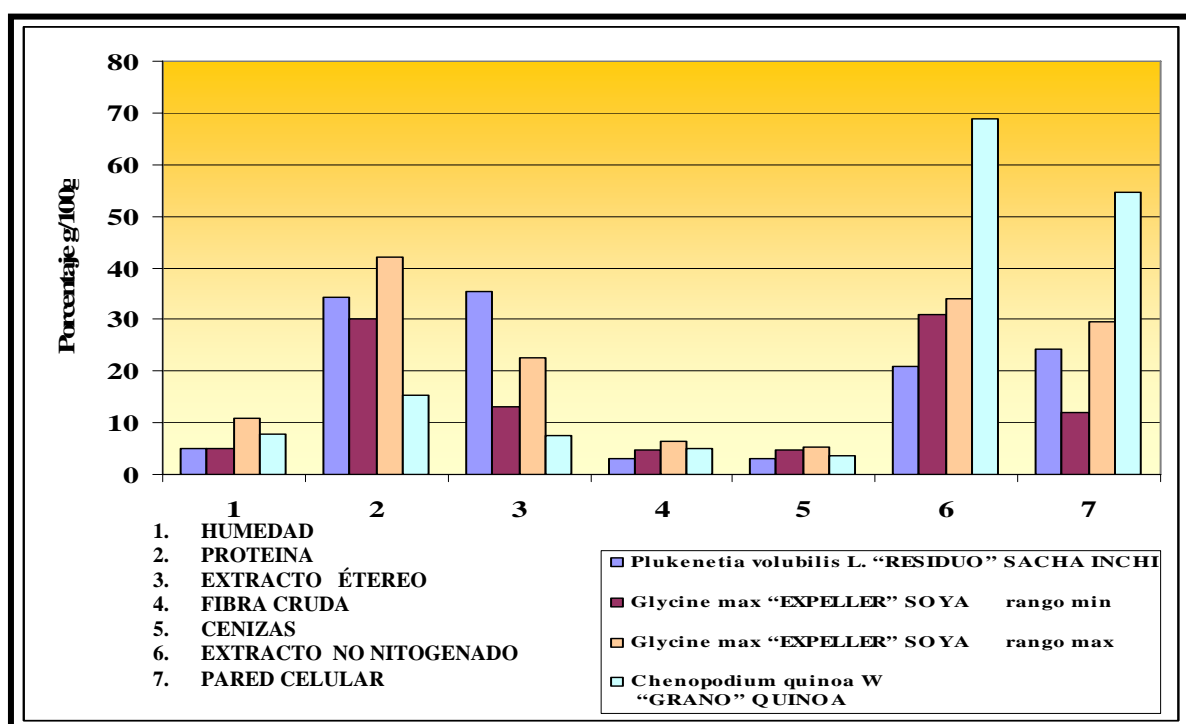


Figura 23. Comparación del análisis proximal de residuos obtenidos de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L., respecto a *Glycine max* L., y *Chenopodium quinoa* W.

Tabla 44. Tabla comparativa de minerales y vitaminas de residuos obtenidos de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L., respecto a *Glycine max* L. y *Chenopodium quinoa* W.

Minerales y vitaminas	<i>Plukenetia volubilis</i> L. Resíduo sacha inchi	<i>Glycine max</i> Expeller soya ¹	<i>Chenopodium quinoa</i> W Grano quinoa ²
Calcio	301,65	200,00	127,10
Fósforo	531,50	620,00	534,48
Hierro	3,97	15,70	16,23
Tiamina	0,31	0,50	0,45
Riboflavina	No detectable	0,80	1,19
Niacina	No detectable	9,00	1,40

Fuente: ¹Gallardo, M et al. (2008)
² Collazos et al (1996). Tablas Peruanas de Composición de Alimentos.

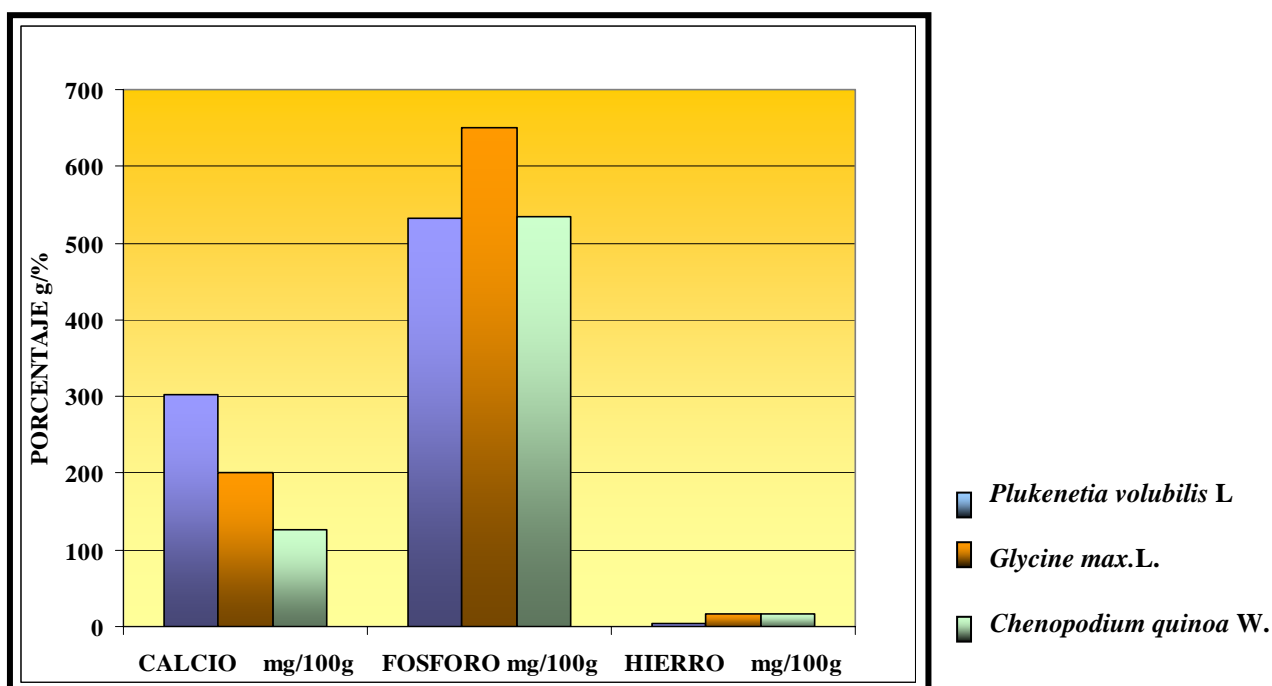


Figura 24. Comparación de minerales, calcio, fósforo y hierro de residuos obtenidos de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L., *Glycine max* L.; *Chenopodium quinoa* W.

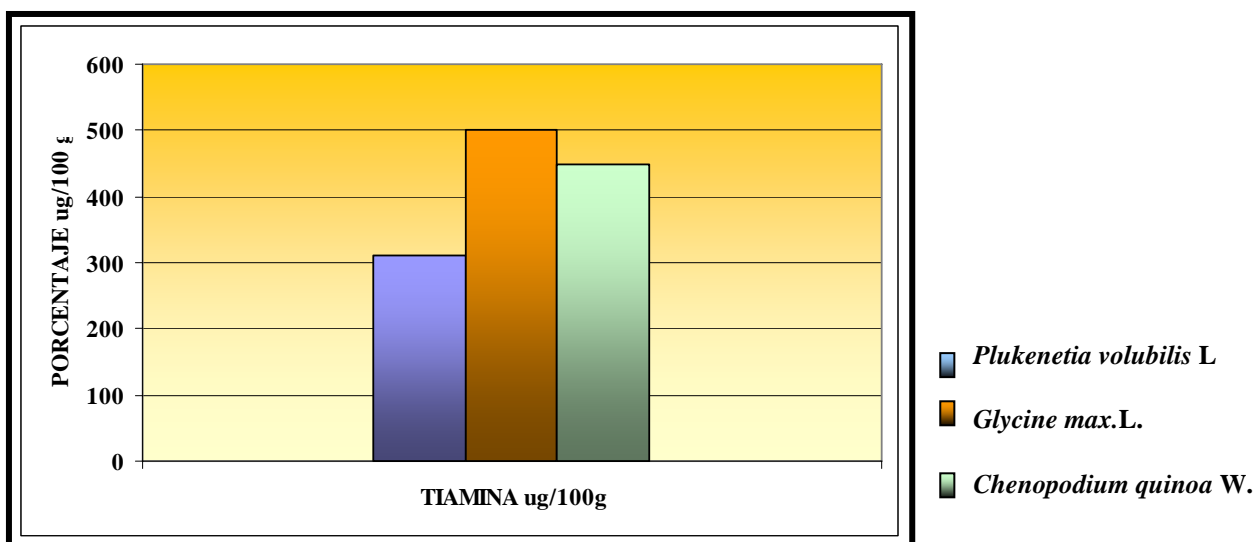


Figura 25. Comparación en µg/g% de tiamina de residuos obtenidos de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L., *Glycine max* L; *Chenopodium quinoa* W.

4.2.6. DIGESTIBILIDAD DE PROTEÍNAS *IN VITRO*

4.2.6.1. Nitrógeno soluble en pepsina

Tabla 45. Resultados de la digestibilidad de proteínas *in vitro* por el método enzimático pepsina de residuos de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L.

Muestra	Proteína indigerible mg	Proteína digerible %
A	4,43	87,07
B	4,57	86,66
C	4,43	87,07
A1	4,50	86,86
B1	4,66	86,40
C1	4,35	87,30
$\bar{X} \pm S$	4,48±0,111	86,89±0,325

4.2.6.2. Digestibilidad enzimática por celulasa

Tabla 46. Resultados de la digestibilidad de proteínas *in vitro* por el método enzimático celulasa de residuos industriales de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”.

Muestra	Residuo 24h (g)	Residuo 48h (g)	Residuo 72h (g)	%DMS	Promedio
A	0,0346	-	-	86,53	87,27±1,47
B	0,0256	-	-	86,32	
C	0,0281	-	-	88,97	
A1	-	0,0217	-	91,38	88,45±2,84
B1	-	0,0288	-	88,26	
C1	-	0,0358	-	85,70	
A2	-	-	0,0176	92,90	90,71±1,73
B2	-	-	0,0258	89,63	
C2	-	-	0,0257	89,60	

4.2.6.2.1. Análisis de varianza de la influencia del tiempo y el porcentaje de digestibilidad enzimática por celulasa

Los tres conjuntos de datos forman muestras aleatorias simples e independientes, extraídas de tres poblaciones que son similares excepto por las condiciones estudiadas.

Hipótesis

Ho: $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ (en promedio las cuatro condiciones producen la misma respuesta)

HA: No todas las son iguales (al menos una condición produce una respuesta promedio diferente del promedio de cuando menos una de las demás condiciones)

Tabla 47. ANOVA de tiempo y %DMS por celulasa

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
%DMS 24H	3	261,82	87,27	2,17
%DMS 48H	3	265,34	88,45	8,09
%DMS 72H	3	272,13	90,71	3,60

Tabla 48. Análisis de varianza de tiempo y %DMS por celulasa

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	18,31	2	9,16	1,98	0,22	5,14
Dentro de los grupos	27,72	6	4,62			
Total	46,03	8				

Decisión estadística

Podemos comparar la F calculada con la F teórica de las tablas para 2 y 6 grados de libertad, con un nivel de significancia α : 0,05: El resultado ANOVA le da el valor estadístico de “F”. El valor de F calculado entre los tres grupos es 0,22 y el obtenido en las tablas F_{0,95; 2,6} es 5,143; $p > 0,05$ para esta prueba.

Podemos afirmar que al ser menor el F calculado que el $F_{0,95; 2,6}$ teórico y ser el p- valor es mayor a 0,05 hemos de aceptar la hipótesis nula y que no hay diferencias significativas en las digestibilidades respecto a las 24, 48 y 72 horas, es decir no hay relación entre las variables.

4.2.6.3. Determinación de aminoácidos

4.2.6.3.1. Prueba de solubilidad y determinación de proteínas del residuo de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L. sacha inchi

En la prueba de solubilidad para la extracción de una mayor cantidad de proteínas, se observó una mejor extracción con el Buffer Tris-HCl 0.05M a un pH 6.5 y a una temperatura de 25°C. y que se corrobora con la determinación de proteínas (método de Lowry).

Tabla 49. Resultados de la prueba de solubilidad en la extracción de la fracción proteica de residuos industriales de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L

	Disolvente	Suero fisiológico	Agua bidestilada	TRIS - HCl
Prueba de solubilidad	Muestra problema	1,02g	1,05 g	1,04 g
	pH	7,0	7,4	6,5
	Temperatura	25°C	25°C	25°C
	Desecho	0,64 g	0,65 g	0,25 g
	Muestra solubilizada	0,37g	0,40g	0,78g
Cuantificación	Longitud de onda	700nm	700nm	700nm
	% proteína (Lowry)	41	37	46

4.2.6.3.2. Extracción y purificación de proteínas totales de residuos de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L. sacha inchi mediante la cromatografía por filtración en gel sephadex G-25.

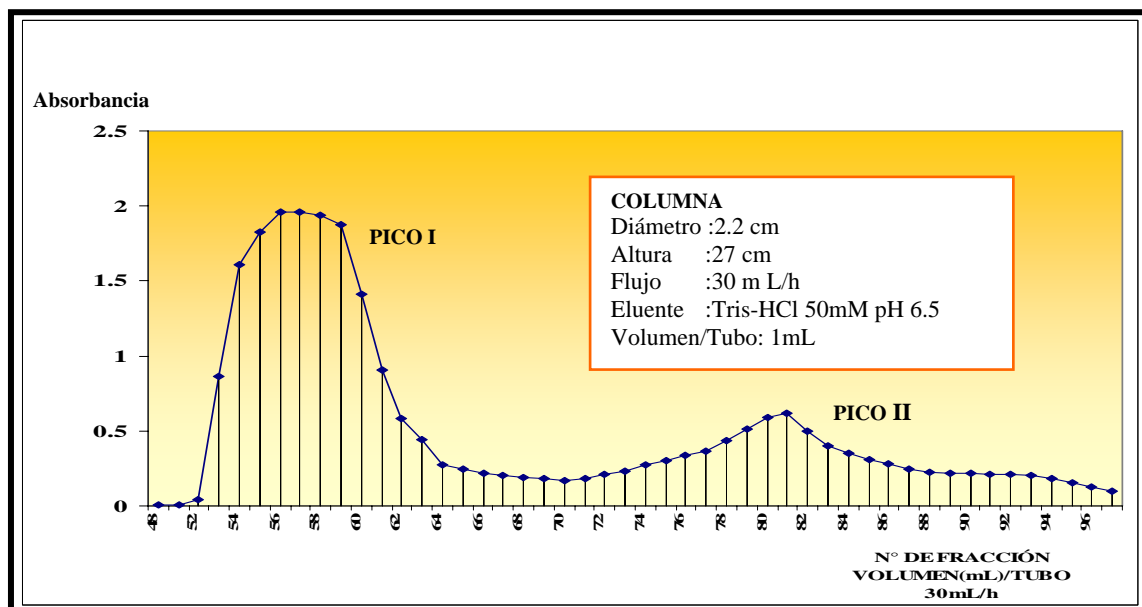


Figura 26. Curva de absorbancias de la fracción proteica de la muestra al 20%

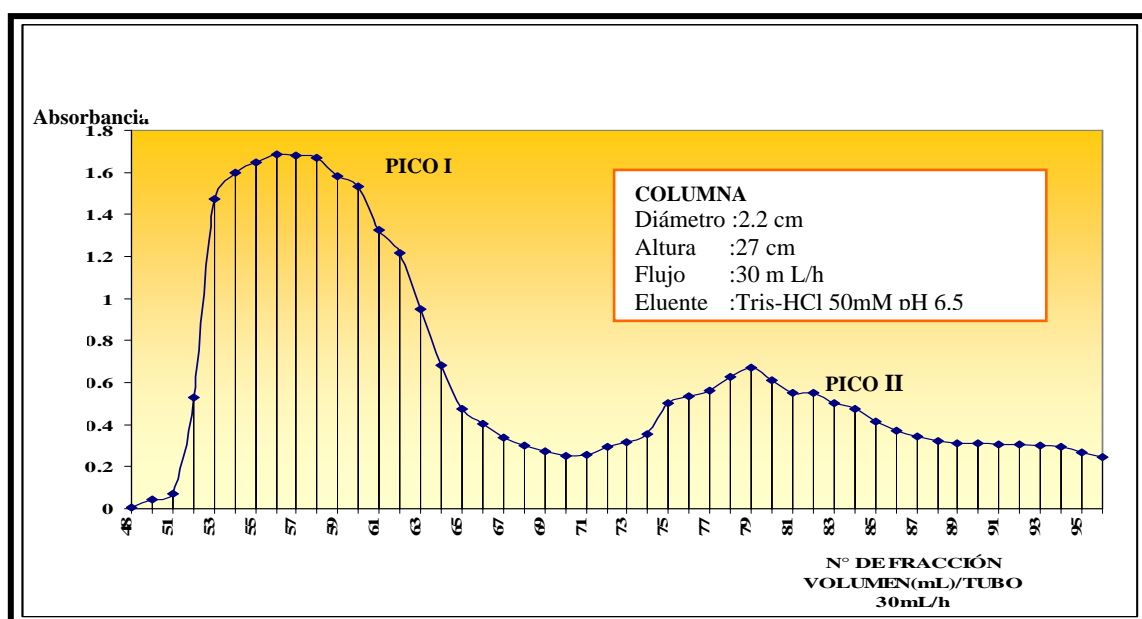
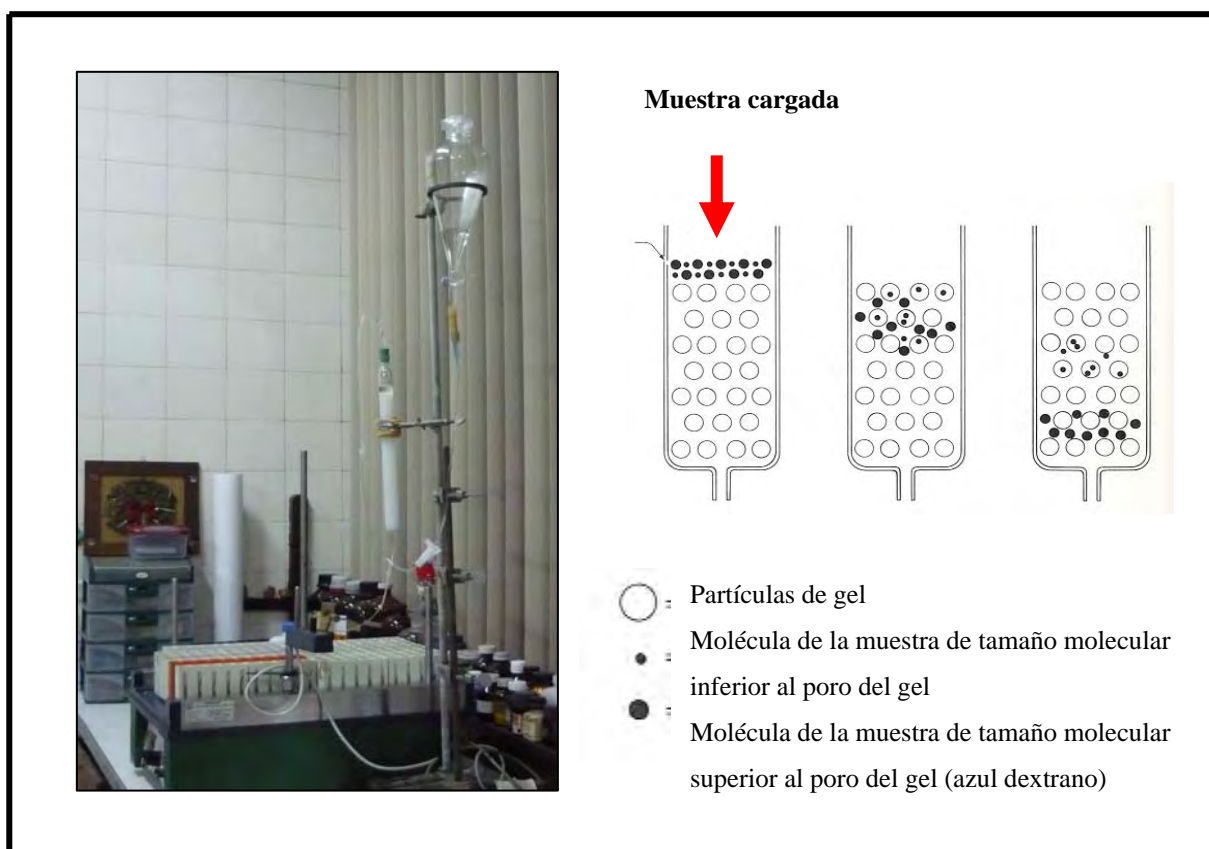


Figura 27. Curva de absorbancias de la fracción proteica de la muestra al 30%

4.2.6.3.3. Valores obtenidos del Pico I de la fracción proteica extraída de las proteínas totales y rendimiento del volumen dializado y peso del liofilizado.

Tabla 50. Condiciones de la fracción proteica del mayor pico (Pico I) de residuos de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L.

Muestra	Concentración (%)	Extracto trasvasado a la columna (mL)	Peso del liofilizado (Proteína soluble) (mg)	Rendimiento Proteína soluble/residuo (%)	Rendimiento Proteína soluble/proteína total (%)
A	20	2mL	45	11.25	21.42
B	30	2mL	57	9.5	18.38
Promedio	25	2mL	51	10.38	19.90



Fotografía N° 6. Izq. equipo recolector de fracciones y cromatografía en columna. Der. mecanismo de flujo de las partículas y moléculas de la cromatografía en columna.

Tabla 51. Aminograma de los residuos de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L. (mg/g) en comparación con *Amarantus caudatus*, *Glycine max* L., *Chenopodium quinoa* W.

Aminoácidos	<i>Plukenetia volubilis</i> L.	Proteína aislada de 35 KDa	Fracción albúmina	Semilla	<i>Chenopodium quinoa</i> W
		<i>A.caudatus</i> (1)	<i>A.caudatus</i> (1)	<i>Glycine max</i> L. (2)	(3)
Aspártico	132	121	18	117	73
Glutámico	239	100	134	187	119
Serina	58	67	72	51	37
Glicina	38	90	174	42	52
Histidina	9	22	40	25	24
Treonina	68	108	72	39	35
Alanina	35			43	47
Arginina	63	29	89	72	71
Prolina	24	54	97	55	31
Tirosina	22	39	33	31	28
Valina	31	64	64	48	45
Metionina	13	18	46	13	20
Isoleucina	180	49	52	45	36
Leucina	69	95	59	78	60
Fenilalanina	9	56	22	49	41
Lisina	39	86	27	54	56

(1) Fuente. Villanueva, O., Arnao, I. Purificación de una proteína de 35 KDa rica en lisina, de la fracción albúmina de *Amaranthus caudatus* (Kiwicha).2007.

(2) Fuente. Hamaker et al. 1992. Universidad de Arkansas, USA.

(3) Aporte de los cultivos andinos a la nutrición humana. Raíces Andinas.Guido Ayala.pag102-111

4.2.6.3.4.1. Análisis de aminoácidos esenciales de los residuos industriales de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L. sachá inchi (mg/g)

TABLA 52. COMPOSICIÓN DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES DE LOS RESIDUOS DE LA EXTRACCIÓN DEL ACEITE DE *Plukenetia volubilis* L. (mg/g) EN COMPARACIÓN CON *A.caudatus*, *Glycine max* L., *Chenopodium quinoa* W, *Chenopodium pallidicaule*, *Oxalis tuberosa*, *Tropaeolum tuberosum*, *Arachis hypogaea* L., *Helianthus annuus* L Y LA FAO/OMS

Aminoácido	<i>Plukenetia volubilis</i> L. sachá inchi**	<i>Chenopodium quinoa</i> W. quinua (1)	<i>Chenopodium pallidicaule</i> cañihua (1)	<i>Amaranthus caudatus</i> kiwicha (1)	<i>Oxalis tuberosa</i> oca (1)	<i>Tropaeolum tuberosum</i> mashua (1)	<i>Ullucus tuberosum</i> olluco (1)	<i>Plukenetia volubilis</i> L. sachá inchi (2)	<i>Glycine max</i> L. soya (2)	<i>Arachis hypogaea</i> L. Mani (2)	<i>Helianthus annuus</i> L. girasol (2)	FAO/OMS
Isoleucina	180	69	64	52	36.36	28.08	41.1	50	45	34	43	52
Leucina	69	67	58	46	53.63	46.53	49.0	64	78	64	64	70
Lisina	39	68	58	67	59.08	33.78	48.0	43	54	35	36	55
Metionina+cisteina	13 ^(*)	33	16	35	25.45	27.90	30.5	37	26	25	34	35
Fenilalanina +tirosina	31	40	35	35	31.81	49.41	59.5	79	80	89	54	60
Treonina	68	45	47	51	45.45	23.69	26.5	43	39	26	37	40
Triptofano	ND	13	8	11	5.50	6.66	9.1	29	13	10	14	10
Valina	31	35	45	45	48.17	40.59	35.0	40	48	42	51	35

Fuente (1): Aporte de los cultivos andinos a la nutrición humana. Raíces Andinas. Guido Ayala. pág. 102-111. (2) Hamaker et al. 1992.Universidad de Arkansas, USA.

(*) : metionina

** : residuo industrial de la extracción del aceite del *Plukenetia volubilis* L.

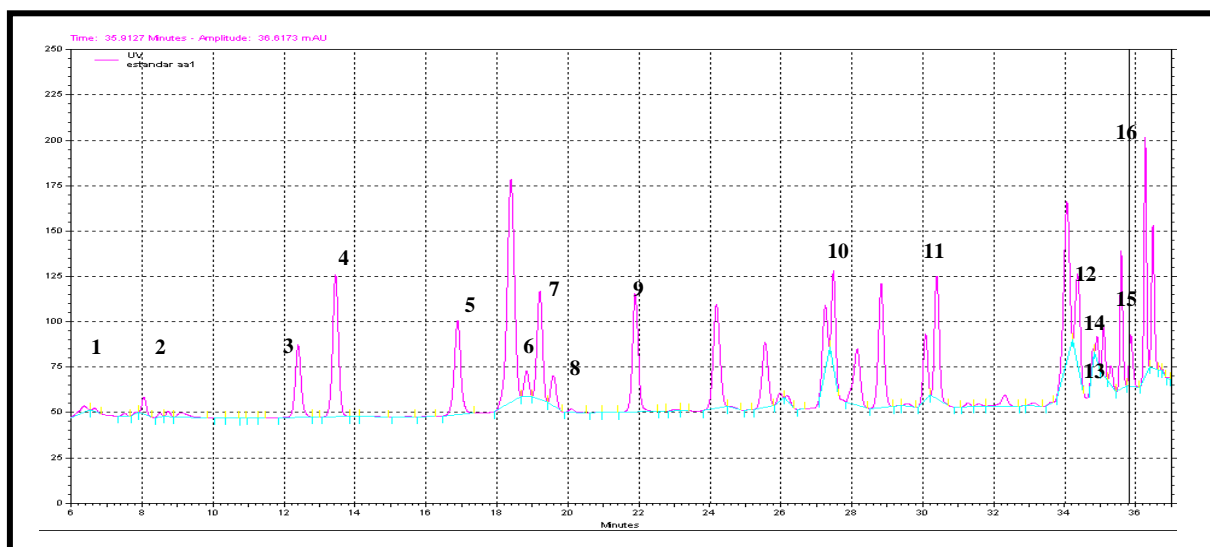
ND : no determinado

4.2.6.3.4.2. Puntaje químico

En las muestras analizadas se observa que el aminoácido limitante en los residuos industriales de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L. es la histidina (48) .No se pueden hacer inferencias sobre el triptófano debido a que no fue posible determinarlo en esta investigación. Empleando el dato teórico de 87% de digestibilidad (nitrógeno soluble en pepsina), el puntaje químico corregido (PQC) para los residuos es 42%.

Tabla 53. Puntaje químico

	Isoleucina	Leucina	Lisina	Metionina	Fenilalanina + tirosina	Treonina	Valina	Histidina
Sacha inchi	180	69	39	13	31	68	31	9
FAO	52	70	55	17	60	40	35	19
PQ	346	99	71	76	52	170	89	48



1. Aspártico. 2. Glutámico. 3. Serina. 4. Glicina. 5. Histidina. 6. Treonina. 7. Alanina. 8. Arginina. 9. Prolina. 10. Tirosina. 11. Valina. 12. Metionina. 13. Isoleucina. 14. leucina. 15. Fenilalanina. 16.

Figura 28. Composición de solución estándar de aminoácidos stock a una concentración de 2.5 $\mu\text{moles} \cdot \text{mL}^{-1}$, en una dilución de 20 μL en 300 μL de buffer acetato de amonio 0.05M, pH 6

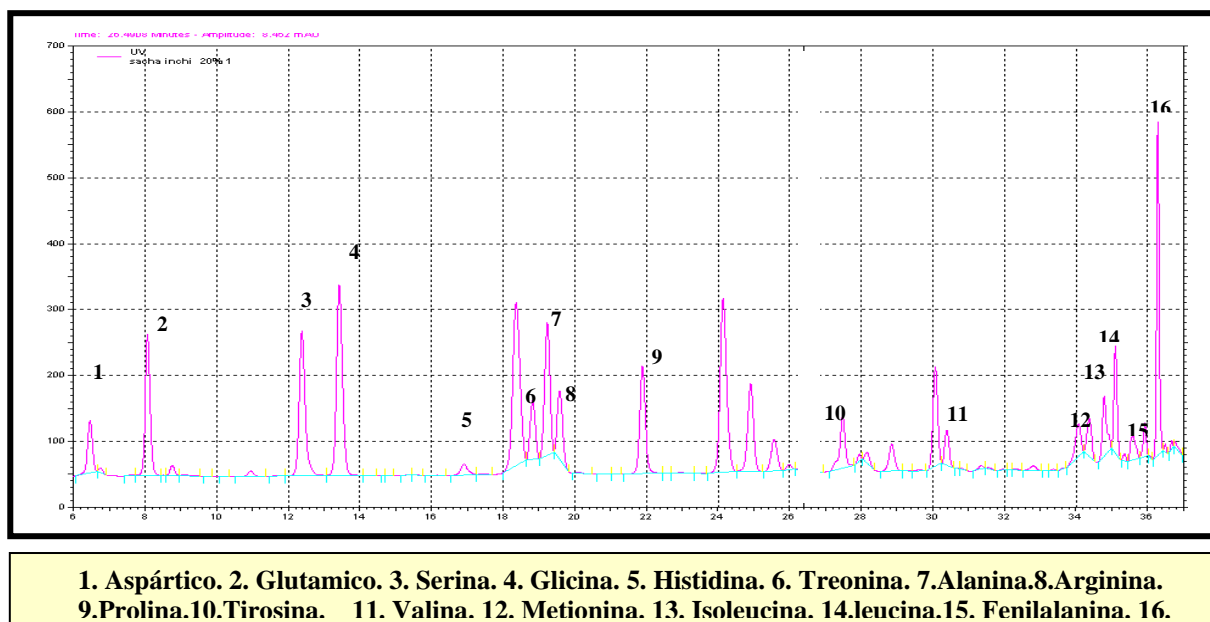


Figura 29. Composición de los aminoácidos de residuos de la extracción de aceite de *Plukennetia volubilis* L. (20%) en una dilución de 3,7mg de proteína soluble en 500 μ L de buffer acetato de amonio 0.05M, pH 6

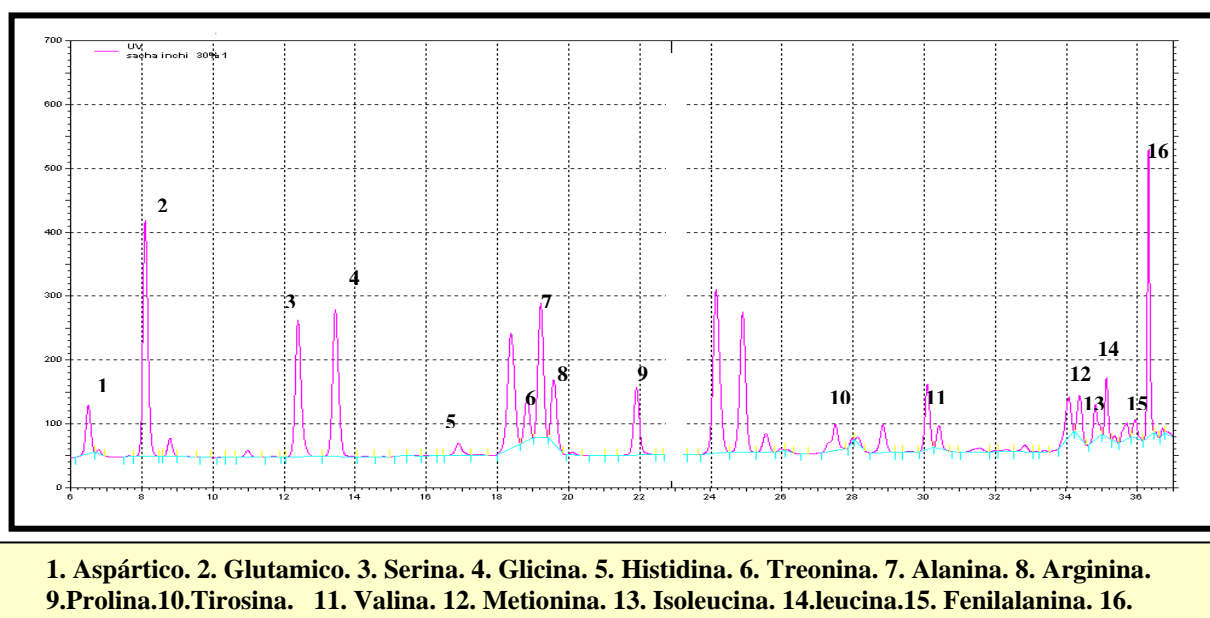


Figura 30. Composición de los aminoácidos de residuos de la extracción de aceite de *Plukennetia volubilis* L.(30%) en una dilución de 3,4mg de proteína soluble en 500 μ L de buffer acetato de amonio 0.05M, pH 6

4.3. EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA A DOSIS LÍMITE

El ensayo de toxicidad aguda a dosis límite de residuos de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L., la dosis administrada en ratas se expresó en: gramos de extracto por kilogramo de peso corporal (tabla 54), según el ensayo de toxicidad a dosis límite por el Método OECD – 420 (tabla 56) y met. Betancourt.

Tabla 54. Resultado de toxicidad aguda oral a dosis límite

ESPECIE	DESCRIPCIÓN	SEXO	2000 mg/kg	TOXICIDAD DOSIS ÚNICA
<i>Plukenetia volubilis</i> L. “sacha inchi”	N° RATAS	HEMBRA	5	> 2000 mg/Kg de peso corporal
		MACHO	5	
	N° MUERTES	HEMBRA	0	
		MACHO	0	

Tabla 55. Comportamiento de la media del peso corporal \pm desviación estándar a los 0, 7 y 14 días.

N° DE DÍAS	N° ANIMALES EN CADA GRUPO	PESO CORPORAL (g)			
		HEMBRAS		MACHOS	
		GRUPO CONTROL	GRUPO TRATADO	GRUPO CONTROL	GRUPO TRATADO
0	5	181,6 \pm 1,3	185,4 \pm 2,7	202,2 \pm 3,6	201,4 \pm 3,13
7	5	202,2 \pm 2,2	206,4 \pm 2,3	221,8 \pm 2,7	226,0 \pm 2,2
14	5	218,4 \pm 3,3	223,2 \pm 3,4	242,8 \pm 3,6	247,8 \pm 2,8

Tabla 56. Rango de masa corporal con relación a la edad en semanas de la especie y línea del modelo biológico

Edad (semanas)	Masa corporal (g)
7-8	180-200
8-9	200-220
9-10	220-240

La masa corporal como indicador de toxicidad, se comportó dentro de los parámetros establecidos para la curva de crecimiento de la especie y línea del modelo biológico utilizado (IFFA CREDO).

4.3.1. ANÁLISIS BIOESTADÍSTICO

4.3.1.1. Análisis de varianza entre los grupos control y tratados hembra y macho, respecto a la ganancia de peso.

Se determinó la media y desviación estándar de los pesos corporales a los 0, 7 y 14 días por sexo y grupo. Se realizó un ANOVA de un factor y un Test de t - Student, para determinar las diferencias entre grupos.

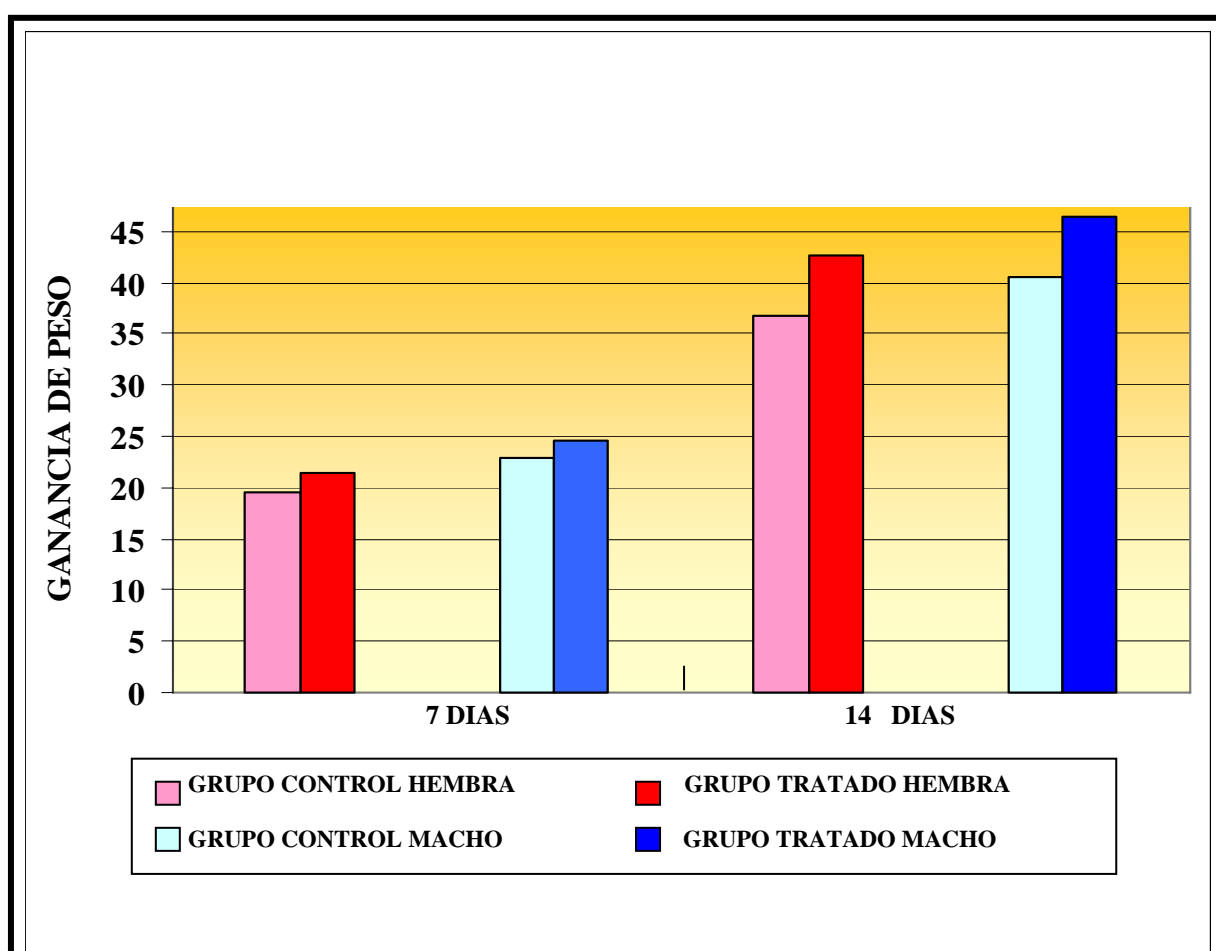


Figura 31. Ganancia de peso en el ensayo de toxicidad aguda a dosis única en el grupo control y tratamiento de hembras a los 7 y 14 días de ensayo.

Supuesto

Los cuatro conjuntos de datos forman muestras aleatorias simples e independientes, extraídas de cuatro poblaciones que son similares excepto por la condición estudiada.

Hipótesis

Se plantea la hipótesis para comparar las medias de los pesos corporales de cada grupo de tratamiento (cantidad de extracto 2g/Kg de peso y días (0,7 y 14))

H₀: El incremento de los pesos corporales de los grupos son iguales

$$\mu_{HC}(\text{hembra control}) = \mu_{MC}(\text{macho control}) = \mu_{HT}(\text{hembra tratada}) = \mu_{MT}(\text{macho tratado})$$

H₁: El incremento de los pesos corporales en los grupos son diferentes

$$\mu_{HC}(\text{hembra control}) \neq \mu_{MC}(\text{macho control}) \neq \mu_{HT}(\text{hembra tratada}) \neq \mu_{MT}(\text{macho tratado})$$

Tabla 57. Resumen de ANOVA para el grupo control y tratado para ambos sexos

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Controlados hembras	3	603,1	201,0	374,4
Controlados machos	3	664,8	221,6	453,7
Tratados hembras	3	615,0	205,0	358,7
Tratados machos	3	670,4	223,5	542,1

Tabla 58. ANOVA para determinar la diferencia entre grupos

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1171,53	3	390,51	0,90	0,48	4,06
Dentro de los grupos	3457,87	8	432,23			
Total	4629,40	11				

Decisión

- Debido a que el valor calculado F es 0,90 es menor que el valor crítico $F_{0,95, 3,8}$ 4,06 se acepta H_0 .
- Se concluye que los cuatro grupos no tienen diferente peso corporal promedio y no mostraron diferencias significativas $p > 0,05$ en ninguno de los tiempos estudiados.

4.3.1.2. Comportamiento del peso corporal para el grupo control y tratado hembra mediante la aplicación del test de t- Student.

Tabla 59. Prueba F para varianzas de dos muestras **Tabla 60. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales**

	TRATADOS	CONTROL
Media	205,80	200,40
Varianza	404,28	339,04
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	1,19	
Valor crítico para F	19,00	

	TRATADOS	CONTROL
Media	205,80	200,40
Varianza	404,28	339,04
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	371,66	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	0,34	
Valor crítico de t	2,77	

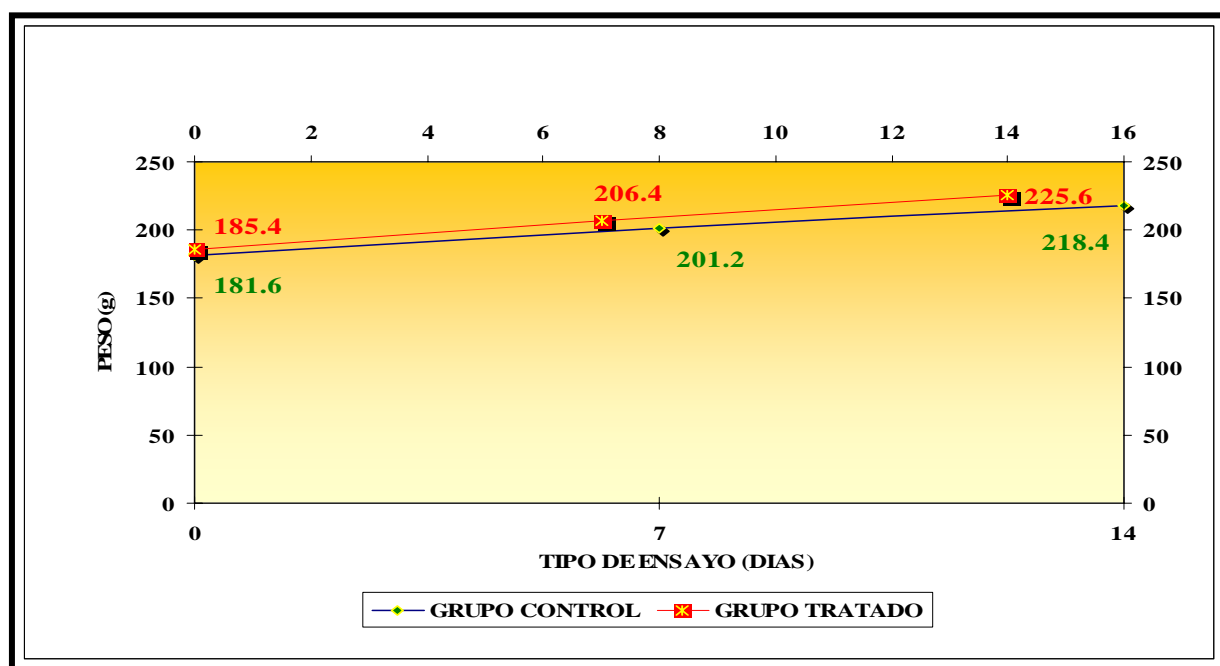


Figura 32. Comportamiento del peso corporal para el grupo control y tratado hembra.

Debido a que el valor calculado t - estadístico es 0,34 es menor que el valor crítico t 2,77; entonces, no existe diferencia del peso corporal de las hembras en los grupos controles y tratados, para un $p > 0,05$ a los 0,7 y 14 días de tratamiento.

4.3.1.3. Comportamiento del peso corporal para el grupo control y tratado macho mediante la aplicación del test de t- Student

Tabla 62. Prueba f para varianzas de dos muestras

	TRATADOS	CONTROL
Media	225,06	222,20
Varianza	538,89	455,16
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	1,18	
Valor crítico F	19,00	

TABLA 63. Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	TRATADOS	CONTROL
Media	225,06	222,22
Varianza	538,89	455,16
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	497,03	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	0,16	
Valor crítico de t	2,77	

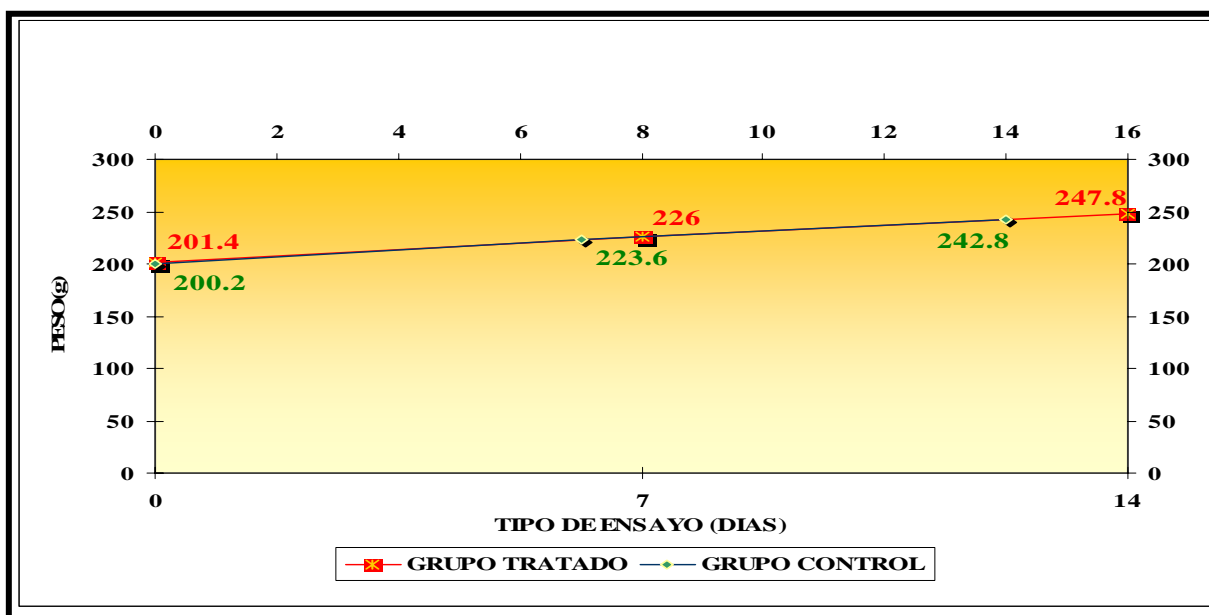


Figura 33. Comportamiento del peso corporal para el grupo control y tratado macho

Debido a que el valor calculado t - estadístico es 0,16 es menor que el valor crítico t 2,77; entonces, no existe diferencia del peso corporal de los machos en los grupos controles y tratados, para un $p > 0,05$ a los 0,7y 14 días de tratamiento

V. DISCUSIÓN

La presente investigación realizó el estudio farmacognóstico y bromatológico de residuos industriales de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L. “sacha inchi”; al mismo tiempo que se confirmándose que en la literatura no existen referencias específicas sobre estos estudios que permitan valorar y desechar y aprovecharlos al 100%, fomentando el desarrollo económico social sostenible que justifica el presente trabajo.

En el estudio farmacognóstico se realizó la marcha fitoquímica realizándose mediante tres extracciones, en cada una de ellas se procedió a la determinación de sustancias solubles, observándose en la tabla 15: extracto etereo, 35%; alcohólico y acuoso, 17%. De cada extracto se obtuvieron respuestas positivas para metabolitos primarios o esenciales que desempeñan funciones vitales para el desarrollo del vegetal ⁽²²⁾, entre los que se destacaron: glúcidos (azúcares reductores), lípidos y aminoácidos. Entre los metabolitos secundarios en las tablas 16, 17 y 18): triterpenos, saponinas triterpenoides, trazas de taninos, estos resultados no han sido reportados, pero según la literatura ^(20,21), la familia Euphorbiaceae se caracteriza por presentar los mencionados metabolitos secundarios.

En la cuantificación de táninos, la curva de calibración en el rango de concentraciones estudiadas para el patrón, demostró ser lineal por tener un coeficiente de correlación mayor a 0.990 (figura 21). De acuerdo al coeficiente de determinación R^2 , se puede concluir que el 99% de las absorbancias pueden ser explicadas por las concentraciones ppm del ácido tánico, con lo que se obtiene 1.3×10^{-5} % de ácido tánico (tabla 23) del residuo de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L. Estos valores son inferiores a los encontrados en: *Krameria triandra* (12%), *Plantago lanceolata* (0.8 – 1.0%), *Medicago sativa*. Los valores obtenidos de los residuos de *Plukenetia volubilis* L. no perjudican su interacción con las proteínas.

Los principales efectos de los taninos se deberían a la interacción de la proteína con los taninos condensados (TC) y con los taninos hidrolizados (TH), los taninos se adhieren con mayor fuerza a las proteínas con alto contenido de prolina. Los taninos afectan la digestibilidad de las proteínas y disminuye la actividad de las enzimas digestivas, por ello su retención de nitrógeno y aminoácidos esenciales. Respecto a los aminoácidos limitantes reducen la disponibilidad de metionina, mientras para las proteínas los valores de digestibilidad varían de 45.5 a 66.7% en comparación con 89.9% de los sorgos (bajos en taninos) que explicaría la alta digestibilidad de los residuos de *Plukenetia volubilis* L.

En la cuantificación espectrofotométrica de saponinas totales se encontró un $0.423 \pm 0.015\%$ de saponinas (tabla 27), valores menores a los encontrados en saponina de: corteza de *Quillaja saponaria* (10%), *Chenopodium quinoa* W. “quinua” (0-6%), *Medicago sativa* “alfalfa” (2-3%); sin embargo, las exigencias del mercado, fijan como valor límite 0.05%. Al respecto las saponinas, son inhibidores del consumo (baja palatabilidad), un ejemplo de ello se ve en los bajos consumos de alfalfa por cerdos, atribuidos a la presencia de saponinas y sus propiedades espumantes que constituyen fuertes interferencias en la absorción intestinal; las especies de mayores concentraciones deben ser manejadas con cuidado en los sistemas de alimentación para evitar trastornos en el metabolismo digestivo; ya que, se unen a nutrientes como el zinc inhibiendo enzimas metabólicas y digestivas.

En el estudio cromatográfico de saponinas en capa fina se confirmó la presencia saponinas triterpenoides, al ser comparadas con saponinas patrón que al ser comparado con *Quillaja saponaria* “jaboncillo” presento un componente, Rf para el patrón 0.60 y 0.62 (fotografía N°2 y 3) y *Glycyrrhiza glabra* presento tres componentes siendo sus Rf 0.62, 0.43 y 0.32 - 0.34 con ambos reveladores y para el residuo 0.62, 0.38 con revelador Lieberman Bouchardat (fotografía N°4) y 0.62, 0.34 encontrados con revelador vainillin fosfórico (fotografía N°5). La literatura reporta la presencia de saponinas triterpénicas en las dicotiledóneas, clasificación adoptada por Engler, especialmente en la familia Euphorbiaceae, Cariofilaceae, Poligalácea y solanácea entre otras; la especie vegetal pertenece a una de las familias mencionadas anteriormente (Euphorbiaceae) y servirá para señalar su posible presencia, que corroboraría la quimiotaxonomía de la familia^(47,65, 66).

En el estudio bromatológico, el análisis químico proximal, se determinó la humedad un bajo contenido de agua (tabla 28) con valor promedio de 5.09 ± 0.057 . Antunez, E (1981)⁽⁶⁷⁾ y Pascual, G., et al (2000)⁽³⁾ encontraron valores similares de agua, 4.2 y 6.37 respectivamente.

En la determinación de proteínas (tabla 29) de acuerdo al método de Kjeldahl (AOAC, 1997), se observó que el contenido de proteínas de los residuos fue de 34.26 ± 0.012 y para residuos desengrasados 51.36 ± 1.41 (tabla 30). Estos resultados son próximos a los encontrados por Antunez, E (1981)⁽⁶⁷⁾; Pascual, G, et al (2000)⁽³⁾; García (1992)⁽⁹⁾ y Hamaker, et al (1992)⁽⁹⁾ encontraron. El valor de proteínas encontrados constituye una alternativa a la torta *Glycine max* L. “soya”, pues la actividad avícola y pecuaria importa aproximadamente cien mil toneladas de torta de *Glycine max* L. “soya” y que actualmente se están formulando mezclas nutritivas. La concentración de proteína y su calidad, se ve influenciada por el proceso de extracción (menos aceite remanente) y si se procesan descascarillados^(41,69).

En el extracto étereo se empleó el método de Goldsfich. Los resultados se muestran en la tabla 31, el contenido de grasa fue de, 37.33 ± 2.87 ; que al compararse con los datos reportados por Antunez, E. (1981)⁽⁶⁷⁾; García (1992)⁽⁹⁾, Hamaker, et. al, (1992)⁽⁹⁾ y Pascual, G., et al (2000)⁽³⁾ se observa que sus diferencias son poco significativas que se explicarían debido al almacenamiento, el cultivo, la época de siembra y cosecha, el tiempo, la temperatura y el tratamiento post-cosecha⁽²⁵⁾. Según Gallardo, G. et al (2008)⁽⁴¹⁾ valores mayores de 9% de extracto (extracción mecánica) y no más de 2% cuando se combina prensa y solvente, evidencia una baja eficiencia industrial; por lo tanto, es exponer el material a la rancidez, porque podría entorpecer otros procesos industriales; por ejemplo, cuando se desean incorporar estas harinas en un balanceado comercial pelletizado; ya que, los materiales aceitosos no corren bien.

El valor obtenido para la fibra cruda en base seca que se observan en la tabla 32, 3.16 ± 1.08 %, al comparar los datos se observa que el valor obtenido está dentro del rango reportado por García⁽⁹⁾, Hamaker et. al,⁽⁹⁾ pero, diferente a lo reportado por Pascual, G. Estas diferencias es muestra del ecotipo analizado, almacenamiento de las semillas, estación de cultivo, post-cosecha y proceso de prensado. La metodología de fibra cruda desarrollado hace más de 100 años se obtienen valores que subestiman al valor y el contenido de fibra insoluble; ya que, el tratamiento alcalino disuelve parte de esta fibra (gasta un 40%)⁽⁷⁰⁾.

En referencia a la fibra detergente neutra Van Soest, había reportado que el 40% de los componentes de la fibra se perdía en el método de fibra cruda⁽¹⁸⁾. Por tal motivo se realizó la determinación en fibra detergente neutra la pared celular (celulosa, hemicelulosa, lignina y sílice), corroborándose la gran variación en la determinación de fibra insoluble por ambos métodos. Se muestra en la tabla 35 que los principios fácilmente digeribles se encuentran en el “contenido celular” del tejido vegetal y en el pool de los residuos estudiados fue de 74.34 ± 2.55 , valor muy elevado que proporciona mayor biodisponibilidad de nutrientes para el consumidor, que está compuesto por proteínas, azúcares solubles y grasas. El envoltorio del contenido celular está determinado por la pared celular, el valor encontrado para este análisis fue de 25.66 ± 2.55 que está formada por una trama o malla de difícil digestión. La composición química de la pared celular varía según la naturaleza y origen de la fibra^(71,72). A mediada que la planta madura se deposita lignina entre la celulosa y hemicelulosa; la lignina es indigerible, contribuyendo a disminuir la digestibilidad de la celulosa y hemicelulosa para rumiantes, para el hombre y animales monogástricos es un irritante de la mucosa intestinal. La fibra detergente neutra está relacionada inversamente a la capacidad de consumo (sensación de saciedad) que el hombre y los animales poseen sobre este alimento. El valor encontrado de la pared celular en comparación a expeler de soya para ganado de leche y carne está dentro de rangos de 12 – 30%, estos valores no influyen negativamente en el consumo y digestibilidad, mientras que resultados de FDN de 63-66% si lo hacen⁽⁴¹⁾.

El valor promedio obtenido de la determinación de FDN es de 16.33 ± 2.74 (tabla 36), valor en el que se encuentra celulosa, hemicelulosa y lignina.

En referencia a la determinación de ceniza (tabla 33) se obtuvo $3.24 \pm 0.33\%$, este valor es muy próximo a los encontrados por Antunez, E. (1981)⁽⁶⁷⁾, García (1992)⁽⁹⁾, Hamaker, E., et al (1992)⁽⁹⁾ y Pascual, G., et al (2000)⁽³⁾.

Respecto al valor de ELN su contenido fue de 20.87, tal como se observa en la tabla 34; observándose variaciones en la composición de azúcares respecto a Antunez, E. (1981)⁽⁶⁷⁾; García (1992)⁽⁹⁾, Hamaker, E., et al (1992)⁽⁹⁾ y Pascual, G., et al (2000)⁽³⁾ debido a diferentes factores como el cultivo, la época de siembra y cosecha, tiempo y temperatura en poscosecha; y además por los distintos procesos generando insumos de composición diferente^(41,73).

La tabla 38, presenta los valores obtenidos para los macroelementos esenciales; calcio y fósforo es 317 y 560 mg/100mg respectivamente. En la tabla 44, el valor de calcio encontrado fue mayor en comparación a la quinua (127 mg/100g de materia seca) y respecto al los expeller de soya que se encuentra en un rango (200- 340 mg/100g de materia seca). El valor de fósforo es significativamente mayor que el encontrado en la quinua real Boliviana (530 mg/100g de materia seca), considerada como la mejor quinua a nivel internacional y está dentro del rango mínimo de los expeller de soya (600 - 790 mg/100g de materia seca). El valor obtenido para el microelemento esencial, hierro es de 4.179, que al compararlo con la quinua, resulta significativamente menor al rango mínimo reportado para la quinua blanca (Junín); 4.89 - 16,8 mg/100g de materia seca.

Respecto a las vitaminas analizadas (tabla 39), detectó la presencia de 0,31 mg/g de tiamina, no reportándose riboflavina ni niacina. La presencia de tiamina se detectó debido a que se encuentra ligada a las proteínas, relacionándose de manera directa a ellas⁽¹⁸⁾. El valor de tiamina hallado en comparación al reportado por la quinua (tabla 44) esta dentro del rango de 0.23-1,16 mg/100g de materia seca y menor para la semilla de soya; 1.1 mg/100g de materia seca

En referencia a la acidez titulable y pH; se obtuvo 0.00023 % de acidez (tabla 42) (gramos de ácido láctico por cada 100g de muestra) a un pH 5.89 (tabla 41). Su valor de acidez superior a 7,0 sugiere una alteración microbiana de la harina. Es importante el pH, ya que, según el pH propio del alimento (acidez natural), se producirá el crecimiento de un tipo u otros microorganismos, así como también influenciará en las reacciones enzimáticas y disponibilidad de nutrientes, entre otros.

Respecto a la determinación de digestibilidad de proteínas *in vitro*, el valor de nitrógeno soluble en pepsina mostró en la tabla 45, un promedio de proteína indigerible de 4.48 y la proteína digerible o total de 86.89 ± 0.325 . Este valor es muy próximo al encontrado por Vela, L, et al. 1994

⁽⁸⁾ (92.24%). La digestibilidad por el método enzimática celulasa, reporto: 90.71 ± 1.73 (tabla 46), valor similar a los obtenida por expeller de soya para ganado de leche y carne, 79-93%⁽⁴¹⁾. La digestibilidad obtenida en los residuos permite conocer el valor nutricional verdadero de las fuentes de proteínas para rumiantes. La alta digestibilidad es muestra de un menor daño de la proteína durante los procedimientos de extracción; ya que, a una temperatura excesivamente alta y por tiempo prolongado hacen que las proteínas cambien su configuración, disminuyendo su digestibilidad, a través de la reacción de Maillard”. La digestibilidad disminuye con el incremento de la madurez del cultivo, principalmente como resultado del aumento en el contenido de carbohidratos estructurales, “pared celular” que son menos digestibles que los componentes solubles, “contenido celular”^(18, 69).

En la determinación de aminoácidos la prueba de solubilidad para la mejor extracción de proteínas de acuerdo a los resultados se obtuvo un mayor rendimiento con el buffer TRIS-HCL 50mM a un pH 6.5, corroborado por el método de Lowry. En la determinación de proteínas Lowry presentó los siguientes resultados para TRIS-HCL, 46%; agua bidestilada, 37% y suero fisiológico, 41%. El rendimiento de proteína soluble obtenido fue de 10.38% en comparación con los residuos de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L., y 19.90% en comparación con las proteínas totales. En la metodología para la determinación de aminoácidos, previa al análisis cromatográfico, las muestras se hidrolizaron en medio ácido y altas temperaturas por dos horas. En estas condiciones, existen reportes de degradación de triptófano, asparagina, glutamina y lisina que explica por qué no fue posible determinar el triptófano, y apunta a la posibilidad que los datos de lisina sean subestimados. Hidrólisis alcalinas de alimentos permiten determinar con mayor exactitud el triptófano, ya que de esta manera se asegura una mejor solubilidad y estabilidad de su estructura⁽⁷⁴⁾. La determinación de la lisina presenta problemas adicionales suele reaccionar a temperaturas elevadas con grupos carbonilos o con la misma proteína, por lo que disminuye su disponibilidad para la cuantificación; al igual que con el triptófano: mediante una hidrólisis alcalina se consiguen mejores resultados^(74, 75). En cuanto al análisis cromatográfico, la metodología empleada para la determinación de aminoácidos en esta investigación tiene la ventaja de ser rápida y sensible; ya que, en menos de una hora de análisis de muestra se identifican simultáneamente 16 aminoácidos. El perfil de aminoácidos obtenido en esta investigación al ser comparado con el patrón de la FAO/OMS y los resultados obtenidos por Hamaker et al. 1992⁽⁹⁾ se observan algunas diferencias (tabla 52); se debe destacar que los residuos industriales de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L., presentan isoleucina, leucina y treonina en mayores proporciones que los del patrón, lo cual es atractivo cuando se desea elegir un alimento candidato para preparar mezclas nutritivas para consumo humano y animal. En los residuos, el aminoácido limitante es la histidina (PQ 48%), con un valor superior al del trigo (PQ 44%) e inferior a la leche (PQ 100%). En vista que el triptófano no es un aminoácido limitante, que reportan la literatura, el no haber generado este dato en el presente estudio, no es un factor crítico para evaluar la calidad de la proteína.

Del ensayo de toxicidad, actualmente se acepta desde el punto de vista regulatorio que no es necesario definir un valor puntual de DL50 para una sustancia y que resulta prácticamente suficiente ubicar dicha dosis en un sólo rango ⁽⁶²⁾. Las regulaciones para la ejecución de este tipo de estudio alternativo de toxicidad aguda plantean que si no existen informes anteriores de toxicidad de la(s) sustancia(s) que se investiga(n) es posible utilizar una dosis límite de 2000 mg/kg de masa corporal, que se ajusta al presente estudio dado que el extracto acuoso del residuo no ha señalado toxicidad en su uso tradicional. En el ensayo realizado, los animales alcanzaron al final del estudio, un 100% de supervivencia, durante el estudio no se observaron signos de toxicidad y los animales mostraron los patrones normales de comportamiento de la especie. Los valores de peso corporal obtenidos en los días 0,7 y 14 en ambos ensayos y sexos, mostraron tendencia a su incremento continuo (tabla 55, figura 31) similar a la curva de peso reportada por la literatura internacional (tabla 56) ^(62, 63). Además en la tabla 59-60 se puede observar que el análisis estadístico (ANOVA) no arrojó diferencias entre grupos ($p>0.05$). Se observó un ligero aumento de peso de los tratados frente a los controles para ambos sexos (figura 32 – 33); sin embargo, mediante el test t-Student, este aumento no fue significativo ($p>0.05$) al compararse con el grupo control, igual sexo (cuadro 62– 63). El peso corporal constituye uno de los principales indicadores de posibles trastornos orgánicos en los estudios de toxicidad y su disminución podría considerarse como efecto tóxico, estos resultados no demostraron que el extracto del residuo de la extracción de *Plukenetia volubilis* L. no afectó el peso corporal de los animales ^(64,76). El ensayo confirma el estudio de Gorriti et., de que al no ocurrir muertes ni signos de toxicidad aparente y de acuerdo a la clasificación de la OECD se considera que los residuos de *Plukenetia volubilis* L., “sacha inchi” no son tóxicos y se encuentra como “No Clasificada”.

De acuerdo a los resultados obtenidos se confirma que los residuos industriales de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L., “sacha inchi” posee un alto valor nutritivo y no tóxico para ser utilizado en muchas formulaciones de mezclas nutritivas en la industria alimentaria.

VI. CONCLUSIONES

1. En el estudio farmacognóstico del residuo industrial de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L., se observó presencia de azúcares reductores; triterpenos; glicosidos y saponinas de núcleo triterpenico, de acuerdo a las reacciones de coloración específicas y manchas características observadas en la CCF. El estudio cuantitativo presentó 1.3×10^{-5} g% de taninos y 0.42g% de saponinas totales.
2. Los análisis bromatológicos confirmaron en el análisis proximal que los residuos de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L.; en g% fueron: humedad, 5.09; proteínas totales, 34.26; extracto etéreo, 37.33; fibra cruda, 3.16, cenizas, 3.24 y carbohidratos 20.84 ; asimismo la determinación en g%:pared celular, 25.66; contenido celular, 74.34; fibra detergente neutra 16.33 y en el contenido de vitaminas de residuos de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L., se halló tiamina tiamina en 0.31 mg % y los % de minerales fueron para calcio, 317.83mg%; fósforo, 560 mg % y de hierro, 4.79 mg %.
3. Respecto a las proteínas por métodos enzimáticos fue de 86.89% para el método enzimático nitrógeno soluble en pepsina y 90.71% para el método enzimático de celulasa; asimismo los valores de aminoácidos esenciales obtenidos en mg/g fueron: histidina, 9; isoleucina, 180; Leucina, 69; lisina, 39; metionina, 13; fenilalanina+tirosina, 31; treonina, 68 y valina 31.
4. En las condiciones del ensayo no se produjo mortalidad ni se manifestaron signos indicativos de toxicidad en los animales. La toxicidad de los residuos se encuentra por encima de 2000mg/kg de masa corporal, calificándose según el Sistema Global Armonizado, como “No clasificadas” (“no tóxicas”).

VII. RECOMENDACIONES

1. Aprovechar la fibra dietética del residuo de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L. en la industria alimentaria como nutrimento debido a su efecto protector frente a diversas patologías.
2. Aplicar los residuos de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi) a procesos tecnológicos para la industria alimentaria (consumo humano y animal), cosmética , industria farmacéutica e ingeniería ambiental.
3. Realizar estudios a la cáscara de la semilla de *Plukenetia volubilis* L. sachá inchi para la determinación de fibra soluble e insoluble y ser aprovechados como fibra alimentaría.
4. Realizar investigaciones complementarias de posibles antinutrientes existentes en los residuos de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L (sacha inchi) que influyen en la digestibilidad y calidad de las proteínas.
5. Realizar estudios de la caracterización bioquímica de las proteínas de residuos de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi); por ser la macromolécula biológica más abundante y de mayor demanda internacional

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **INIA** [sede Web]Tarapoto: Gloria Arévalo Garazatúa;2000[acceso 3 de noviembre de 2007]. El cultivo del sacha inchi (*plukenetia volubilis* L.) en la Amazonía. Disponible en: <http://www.fao.org/ag/aGL/agll/rla128/inia/inia-i5/inia-i5.htm>.
2. **Huamán, J.; Chávez, K.; Castañeda, E.; et al.** Efecto de la *Plukenetia volubilis* Linneo (sacha inchi) en la trigliceridemia posprandial. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2008; 69(4):263-6.
3. **Pascual, G.; Mejía, M.** Extracción y caracterización del aceite de sacha inchi. *Anales Científicos UNALM*. Lima. 2 000. Enero-Marzo (42): 144 – 158.
4. **Gorriti, A.; Córdova, A.; Arroyo, J.; et al.** Estudio farmacognóstico, toxicidad aguda oral y actividad hipolipemiante de las semillas de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi). IX Jornadas de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas “Dra. Bertha Pareja Pareja”. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 2006.
5. **Gorriti, A.; Córdova, A.; Arroyo, J.; et al.** Formulación y Fase I de un alimento funcional del aceite de de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.). X Jornadas de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas “Dr. José Amiel Pérez”. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 2007.
6. **Arevalo, G.** Colección, caracterización y mantenimiento de germoplasma de oleaginosas nativas. In Tarapoto, Perú. INIA, Estación Experimental El Porvenir. Informe Anual 1990-1995. Tarapoto s.p.
7. **Benavides, J.; Morales, J.;Pascual, G.** Avance en la caracterización del aceite y proteína del cultivo de sacha inchi o maní de monte (*P. volubilis* L.) como alternativa para la alimentación humana y animal, [Progress on the characterization of oil and protein contents of *Plukenetia volubilis* as an alternative for human and animal feeding. Yurimaguas (Perú). Instituto Nacional de Investigación Agraria. 1994. 17 h.
8. **Higuchi, S.** Proyecto de Ley N° 11367/2004 – C12: Ley que declara al sacha inchi como patrimonio genético Nacional y producto alternativo en la lucha contra la pobreza. Lima, 08 septiembre 2004.
9. **Hamaker, E.; et al.** “Aminoacid and Fatty Acid Profil of the Inca Peanut (*Plukenetia volubilis* L)”. American association of cereal chemist. 1992. Note, Vol.69.N°4. p. 461- 465
10. **Soukup, J.** Vocabulario de los nombres vulgares de la flora peruana. Imprenta Colegio Salesiano, Lima. 1970.

11. **Brack, A.;Bravo, F.** Perú: Legado milenario - Millenary Legacy. Lima. Publicado por Universidad de San Martín de Porres, Escuela Profesional de Turismo y Hotelería, 2005. p. 168
12. **Brack, A.** *Plukenetia volubilis* L. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. PNUD. Cuzco – Perú.1 999. p. 550
13. **Valles, C.R.** El "sacha inchi", planta nativa de importancia proteica y aceitera promisor para la selva alta. Separata, 2 p. 1990.
14. **Enrique, Q.; Yesid, M.** Especies vegetales promisorias de los países del convenio Andrés Bello. Programa de Recursos Vegetales del Convenio Andrés Bello, Secretaría Ejecutiva Permanente del Convenio Andrés Bello. Publicado por Secretaria Ejecutiva del Convenio Andres Bello, 1989
15. **Arevalo, G.** Colección, caracterización y mantenimiento de germoplasma de oleaginosas nativas. In Tarapoto, Perú. INIA, Estación Experimental El Porvenir. Informe Anual 1990-1995. Tarapoto s.p.
16. **Catalogo de la Biodiversidad de Colombia** [Sede Web]. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt; 2007 Linares J. [actualizado miércoles, 27 de junio de 2007; acceso 3 de noviembre de 2008]. *Plukenetia volubilis* L Disponible en: <http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=319&method>
17. **Gatel, F.; Grosjean, F.** Composition and nutritive value of peas for pigs: a review of European results. Livest. Prod. Sci. 1990; 26:155-175.
18. **Kuklinski, C.** Nutrición y Bromatología. Editorial OMEGA S.A. Barcelona. 2000
19. **Leyva, L.** Prueba de digestibilidad In vitro con diferentes proporciones de saliva artificial y flora microbiana en alpacas. Tesis Bachillerato. Fac. Medicina Veterinaria, Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Lima 2000. 33 p.
20. **Bressani, R.** Protein Quality of High-Lysine Maize for Humans.Cereal Foods World.1991; 36(9):806-811.
21. **Pellet, P.; Young, V.** Nutritional Evaluation of Protein Foods. The United Nations University.1980.
22. **Wathelet, B.** Nutritional analysis for proteins and amino acids in beans (*Phaseolus* sp.). Biotech. Agron. Soc. Environ.1999; 3:197.
23. **Hart, D.; Sccott, J.** Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods,and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commoly aonsumed in the UK. Food Chemistry.1995; 54:101-111.
24. **Anders, J.C.** Advances in Amino Acid Analysis.Biopharm Info.2002; 18:32-39.
25. **Rubinson, K.; Rubinson, J.** Análisis Instrumental. Primera edición. Prentice Hall.España.2000
26. **Fontaine, J.; Horr, J.; Schirmer, B.** Amino acid contents in raw materials can be precisely analyzed in a global network of Near-Infrared Spectrometers: Collaborative trials prove the

- positive effects of instrument standardization and repeatability files. Journal of Agricultural and Food Chemistry.2004; 52: 701–708.
27. **Quattrocchi, O.; Abelaira, S.; Felipe, R.** Introducción a La HPLC aplicación y práctica. Buenos Aires 1992.
 28. **Instituto Nacional de Salud (INS).** I Foro “Investigación y biocomercio de plantas medicinales y alimenticias de uso tradicional en el Perú”.2008
 29. **Reategui, V.** Evaluación de la torta de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi) y su uso como fuente alternativa y proteica en la alimentación de pollos de engorde y gallinas de postura en Zúngaro Cocha-UNAP”. 2008
 30. **Lovon, C.; Echegaray, P.** Elaboración de mantequilla de sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) y su caracterización. Lima:USIL, 2006.150p.
 31. **Manco, E.** Cultivo de Sacha Inchi. [monografía en Internet].San Martín-Perú. Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología; 2006[acceso 3 de noviembre de 2008]. Disponible en: <http://www.incainchi.es/pdf/1358.pdf>.
 32. **Carazo, I.; Fassbender, K.; Velazco, A.** Mercados potenciales para el Biocomercio de plantas medicinales y alimenticias, y experiencias de acceso a mercados externos para productos naturales. Instituto Nacional de Salud (INS). I Foro “Investigación y biocomercio de plantas medicinales y alimenticias de uso tradicional en el Perú”.2008. 14-17.
 33. **Sondeo de mercado para el sistema de biodiversidad**[documento de Internet]* 2006 [3 de diciembre 2008].Dirección electrónica en:
<http://www.humboldt.org.co/obiBiocomercio/documentos/Sondeo%20aceite%20sacha%20inchi%20final.doc>
 34. **Más cultivo de sacha inchi.** [Economía online] 2006, 18 de febrero. [acceso 4 de diciembre de 2008];Disponible en:
http://www.peru.com/finanzas/ideos2/2006/2/18/DetalleDocumento_282607.asp
 35. **ADEX.** Sacha inchi. *Plukenetia volubilis* L. Impulsemos el desarrollo sostenible.2006 [acceso 2 de octubre de 2008].Dirección electrónica en:
<http://www.juanjuonline.net/sachainchiempresaseuropeas.htm>
 36. **Meza, V.** La Agroindustria en el Perú y los residuos sólidos. 2008[documento de Internet] 2008 [7 de noviembre de 2008]. Dirección electrónica en:
<http://www.lamolina.edu.pe/eventos/cemtrar/compost/presentaciones/4.pdf>
 37. **Ley General de Residuos Sólidos LEY Nº 27314.** 2000[documento de Internet] 2009 [7 de agosto de 2009].Dirección electrónica en: <http://www.mtc.gob.pe>
 38. **Comisión Europea.** Panorama of EU Industry. Bruselas.1997. Vol. I.
 39. **Organización Internacional del Trabajo (OIT)** [Sede Web]. La evolución tecnológica y el empleo en las industrias de productos alimenticios y bebidas. Informe para el debate de la Reunión tripartita sobre La evolución tecnológica y el empleo en las industrias de productos

- alimenticios y bebidas. 2008 [actualizado miércoles, 3 de Agosto de 2008; acceso 3 de noviembre de 2008]. Disponible en:
<http://www.lamolina.edu.pe/eventos/cemtrar/compost/presentaciones/4.pdf>
40. **Meza, V.** La Agroindustria en el Perú y los residuos sólidos. 2008 [documento de Internet] 2008 [7 de noviembre de 2008]. Dirección electrónica en:
<http://www.lamolina.edu.pe/eventos/cemtrar/compost/presentaciones/4.pdf>
41. **Gallardo, M.** “Soja, harinas de extracción para la alimentación del ganado. Un análisis de las cualidades nutricionales de los diferentes tipos, de acuerdo al método de extracción utilizado”. Revista de Producción Animal. Junio 2008. Vol. 6. N° 1.
42. **Hughes, W.** Minería: Desarrollo o Destrucción. Primera Edición. Panamá. 1998.
43. **Pérez, M.** Desarrollo Humano Sostenible Y Estudio De Impacto Ambiental [Revised November 2003]. URL disponible en: <http://www.panamaprofundo.org> [fecha de acceso 3 de enero de 2009].
44. **Ministerio de Agricultura.** Ley Orgánica del Ministerio de Agricultura, Decreto Ley N° 25902. Lima, 28 de noviembre de 1992.
45. **Gorriti, A.; Jurado, B.; Quispe, F.** Manual de Laboratorio I y II. UNMSM. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Cátedra de Farmacognosia y Medicina Tradicional. Lima. 2004.
46. **Gibaja, S.** Guía para el análisis de los compuestos del carbono. UNMSM. Dirección Universitaria de Biblioteca y Publicaciones. Editorial UNMSM. Lima. 1977.
47. **Trease-Evans.** Farmacognosia. Ediciones Mc.Graw Hill. Editorial Interamericana. Décimo Tercera Edición. México D.F. 1991.
48. **Randerath, K.** Cromatografía de capa fina. Enciclopedia de la Química Industrial. Tomo VIII. Editorial Urmo S.A. Segunda edición. Bilbao. 1970.
49. **Dominguez, A.** Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. 1979; p. 81, 86, 93, 149-150.
50. **Lock, O.** Investigación fotoquímica. Métodos en el Estudio de Productos Naturales. Pontificia Universidad Católica; Lima 1994, 2da edición. p. 159-171.
51. **Lastra, H.; Rodríguez, E.; Ponce, H.; Gonzáles, M.** “Método analítico para la cuantificación de taninos en el extracto acuoso de romerillo”. Rev Cubana Plant Med 2000; 5(1):17-22.
52. **Vigo, C.; Narita, E.; Marqueza, L.** “Validación de una metodología de cuantificación espectrofotométrica de las saponinas de *Puffia glomerata* (Spreng) Pedersen *Amaranthaceae*”. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2003; 14(1): 46 – 49
53. **Arbaiza, T.** Manual de procedimientos para el análisis proximal de alimentos. UNMSM. Facultad de Medicina Veterinaria. Departamento Académico de Producción Animal. Lima. 2005

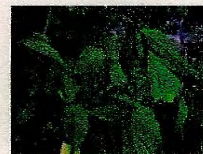
54. **AOAC.** Association of Official Analytical Chemists USA - Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Ed. Sydney Williams 14th ed. Washington, D.C.1997
55. **AOAC.** Official Methods of Analysis. 1997. Pepsin digestibility of animal protein feeds. P 78 – 79. EEUU.
56. **AOAC.** Official Methods of Analysis of AOAC International: Agriculturalchemical, contaminants, drugs. 17th edition. USA, Published by AOAC. International. 2000. Vol. I. v. 3 pp.24 -25, v.2.pp.15.
57. **Arnao, I.; Villanueva, O.** Purificación de una proteína de 35 kDa rica en lisina, de la fracción albúmina de *Amaranthus caudatus* (Kiwicha).Anales de la Facultad de Medicina, UNMSM. Lima, diciembre 2008. 68(4).
58. **Monteghirfo, M.; Álvarez, J.; Espinoza, S.; Ramos, R.** Caracterización bioquímica de las proteínas de *Lepidium meyenii* (maca) procedentes de Junín. En: I Jornadas de Investigación en Salud. Lima: Facultad de Medicina, UNMSM; 1999.
59. **Monteghirfo, M.** Determinación de Aminoácidos de Quinua y Kañiwua por HPLC.Theorema .Revista de Investigación de la UNMSM.Lima.1994.p.60-61.
60. **Sathe, S.; Hamaker, B.; Sze-Tao, K.; Venkatachalam, M.**Isolation, purification, and biochemical characterization of a novel water soluble protein from Inca peanut (*Plukenetia volubilis* L.). J Agric Food Chem. 2002 Aug 14; 50(17):4906-8.
61. **Nelson, D.; COX, M.** Lehninger Principios de Bioquímica”. 3era. Edición.Edición Omega.2000.p.115-158.
62. **OECD.** Repeated dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. Guideline for the testing of Chemicals. 1995: 1-8
63. **OECD.** Guidelines for testing of chemicals. Acute oral toxicity. Acute Toxic Class Method.Organization for Economic Co-operation and Development. Guide No. 423, 2000 [RevisedDraft Guideline October 2000]. URL disponible en: <http://www.oecd.org> [fecha de acceso 11 de noviembre de 2008].
64. **Martínez,J.; Betancourt, J.; Ramírez, A.; Barceló, H.; Meneses, R.; Lalnez, A.**Evaluación toxicológica aguda de los extractos fluidos al 30 y 80% de *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (caña santa). Rev Cubana Plant Med. 2000. 5(3):97-101. URL disponible en:http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol5_3_00/pla06300.htm [fecha de acceso 11de noviembre de 2008].
65. **Porres, C.** “Cuantificación de saponinas esferoidales frutos,semillas y corteza de *Sapindus saponaria*”. “Jaboncillo”.Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia .Universidad de San Carlos de Guatemala. Agosto 1999. Dirección electrónica en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_1993.pdf

66. **Strasburger, E; Nol, F; Schink,H;Schimper,A.** “Tratado de Botánica”. Editorial Marin. 1981.
67. **Antunez de Mayolo R., S.E.** 1981 Amuio-o: sumo entre semillas oleoproteicas. Bol. de Lima, No. 11:11-15.
68. **García, H.** Resumen de investigaciones apoyadas por Fundeagro 1988 1992.Tomo I. Proyecto de transformación de la tecnología agropecuaria. TTA. Lima 1992. p.61-63.
69. **Oramas, C.; Vivas, N.** “Evaluación de dos híbridos y una variedad de maíz (*Zea mays*) en monocultivo y en asociación con fríjol (*Phaseolus vulgaris*),para ensilaje”.Revista de Ciencias Agropecuarias. Marzo 2007.Vol.5.Nº1.
70. **Garcia, O.; Benito, R.; Julio, C.** “Hacia una determinación de fibra alimentaria”.Anales Venezolanos de Nutrición. Caracas. Junio 2008. 21(1).
71. **Mastrapa, L.; Medero, C.; Rodriges, J.** “Evaluación dela fibra dietetica insoluble y del nitrógeno asociado a esta fracción en alimentos para cerdos”. Evento Porcicultura 96, palacio de las Convecciones, Ciudad de la Habana.1994.
72. **Savon, L.; Gonzales, T.** “Fibra dietética en especies monogástricos”.Trabajo presentado en la I conferencia de Agricultura Sostenible. Gerona, isla de la Juventud.1996.
73. **Chirinos, A.** “Obtención y caracterización de oligofructanos y la inulina de Raiz de Bacon (*Smallanthus sonchifolia*, Poepp. & Endl.H. Robinson)”.Tesis para magíster en industrias alimentarias. 1999. UNALM.
74. **Hurrett, E.** Estabilidad de Lisina. J. Food Sci. 1999. (US) 44:1221-1231, 1237.
75. **Yúfera, P.**Química de los Alimentos. España, Editorial Síntesis.1998.pp.25-38.
76. **OECD.** Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental. Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, 1998 in November 1998.

IX. ANEXOS

ANEXO N°1. Certificación botánica de *Plukenetia volubilis* L. (sacha inchi)

José R. Campos de la Cruz
CONSULTORIO BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Teléfono: 5373629
e-mail: joricampos@yahoo.es



CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ, Biólogo Colegiado, CBP 3796.

Certifica que:

IRIS GIOVANA MONDRAGÓN TARRILLO

Bachiller en Farmacia y Bioquímica. Ha solicitado la determinación científica de una planta conocida con el nombre vulgar de “sacha inchi”, la muestra ha sido estudiada y determinada científicamente como: *Plukenetia volubilis* L. Según el Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist et. al. 1981, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

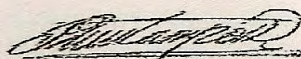
REINO	: PLANTAE
DIVISIÓN	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	: ROSIDAE
ORDEN	: EUPHORBIALES
FAMILIA	: EUPHORBIACEAE
GENERO	: <i>Plukenetia</i>
ESPECIE	: <i>Plukenetia volubilis</i> L.

Nombre vulgar: “sacha inchi”

Se expide la presente certificación para los fines que estime conveniente.


Lima, 23 de enero del 2008




Jose R. Campos De la Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jirón Sánchez Silva N° 156. Urbanización Santa Luzmila – Lima

ANEXO N°2. Informe de ensayo de la determinación de fósforo, calcio y hierro de los residuos industriales de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L. sacha inchi



INFORME DE ENSAYO N° 3-07517/08

Pág. 1/1

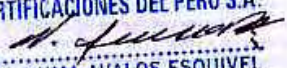
Solicitante	: MONDRAGON TARRILLO, IRIS GIOVANA
Domicilio Legal	: Jr. Puno N° 1002 – Lima
Producto Declarado	: RESIDUOS INDUSTRIALES DE LA EXTRACCION DEL ACEITE DE PLUKENETIA VOLUBILIS (SACHA INCHI)
Cantidad de muestra	: 01 muestra x 800 g
Forma de Presentación	: En bolsa de polietileno, sellada y conservada a temperatura ambiente
Fecha de recepción	: 2008 – 07 – 15
Fecha de inicio del ensayo	: 2008 – 07 – 16
Fecha de termino del ensayo	: 2008 – 07 – 19
Ensayo realizado en	: Laboratorio Fisico Quimica
Identificada con	: H/S 080306823 (10180) Muestra proporcionada por el solicitante.

Ensayos	Resultados
Fósforo (g/100g)	0,56
Calcio (mg/kg)	3178,31
Hierro (mg/kg)	41,79


Método:
Fósforo: AOAC 965.17 Vol I, C 4, pp. 44-45, 17 Th Ed. 2000. Phosphorus in Animal Feed and Pet Food. Photometric Method.
Calcio: AOAC 975.03, c 3, 18 Th Ed. 2005. Metals in Plant and Pet Foods.
Hierro: AOAC 975.03, c 3, 18 Th Ed. 2005. Metals in Plant and Pet Foods.

OBSERVACIONES
Prohibida la reproducción total o parcial de este Informe, sin la autorización escrita de CERPER S.A.
Los resultados de los Análisis no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce.

Callao, 21 de Julio del 2008
bgg

CERTIFICACIONES DEL PERU S.A.

ING. NUMA AVALOS ESQUIVEL
C.I.P. N° 96872
COORDINACIÓN DE LABORATORIOS

ANEXO N°3. Certificado de ensayo de la determinación de las vitaminas tiamina, riboflavina, niacina de los residuos industriales de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L. sacha inchi.



Sociedad de Asesoramiento Técnico S.A.C.
JR. ALMIRANTE GUISE N° 2580 - TELEFONOS: 222-0518 222-0611 221-3431 LIMA 14 - PERÚ
TELEFAX: 221-3441 - 221-4965 - 222-0512 * página web: www.satperu.com
e-mail: satperu@satperu.com / prod.farmaceuticos@satperu.com


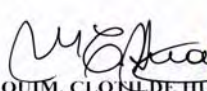
INFORME DE ENSAYO N° DT 9491-2008

PRODUCTO	:	RESIDUOS INDUSTRIALES DE LA EXTRACCION DEL ACEITE DE <i>Plukenetia Volubilis</i> L. (Sacha inchi)
SOLICITADO POR	:	IRIS GIOVANA MONDRAGON TARRILLO
DIRECCION	:	JR. GUZMAN BARRON No. 3856 – SAN MARTIN DE PORRES - LIMA
FECHA DE RECEPCION	:	2008-11-17 (MUESTRA PROPORCIONADA POR EL CLIENTE)
FECHA DE ANÁLISIS	:	2008-11-18
SOLICITUD N°	:	DT-2564-2008

IDENTIFICACION DE LA MUESTRA	:	NINGUNA
ESTADO / CONDICION	:	PRODUCTO MOLIDO / TEMPERATURA AMBIENTE
PRESENTACION	:	BOTELLA DE POLIETILENO TRANSPARENTE ANUDADO SIN LITOGRAFIAR
CANTIDAD DE MUESTRA	:	01 UNIDAD x 500g APROX
MUESTRA DIRIMIENTE	:	NINGUNA (A SOLICITUD DEL CLIENTE)

ANALISIS	RESULTADOS	METODO DE ENSAYO
Tiamina mg/100g	0.31	AOAC 942.23 (2005) Cap. 45 Pg. 9-10 de XVIII. USA 2005. Tiamina (Vitamina B1) en alimentos. Metodo Fluorometrico
Riboflavina mg/100g (Limite de cuantificación : 0.39mg/100g)	No Detectable	AOAC 970.65 (2005) Cap. 45 Ed. XVIII Pag. 9 Riboflavin (vitamin B2) in foods and vitamin preparations, Fluorometric Method
Niacina mg/100g (Limite de cuantificación : 2.623mg/100g)	No Detectable	AOAC 961.14 (2005) Cap. 45 Ed. XVIII , Pag.12 Niacin and Niacinamide in drugs, foods and feeds. Colorimetric method

LIMA, 24 DE NOVIEMBRE DEL 2008



QUIM. CLON DE TARRILLO
JEFE DIVISION TECNICA
C.Q.P N° 296

- PAG. 1 DE 1 -

INFORME DE ENSAYO EMITIDO EN BASE A LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN NUESTRO LABORATORIO
VALIDO POR 90 DIAS UNICAMENTE PARA LA MUESTRA PROPORCIONADA
QUEDA ABSOLUTAMENTE PROHIBIDA TODA REPRODUCCION PARCIAL DEL PRESENTE
INFORME SIN LA AUTORIZACION PREVIA Y EXPRESA DE SAT S.A.C

/L.E

FDT 22/DICIEMBRE 2007

ANEXO 4. Semilla y residuos de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L. sacha inchi

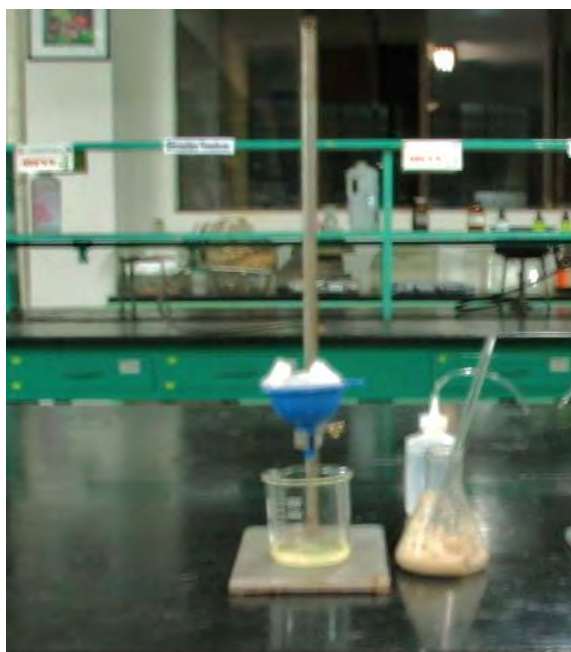


Fotografía N°7. Semillas de *Plukenetia volubilis* L. sacha inchi.



Fotografía N°8. Homogenizado deshidratado de las muestras de los residuos industriales de la extracción de aceite de *Plukenetia volubilis* L. sacha inchi.

ANEXO 5. Ambientes del laboratorio de Farmacognosia y Química Orgánica



Fotografía N°9. Filtración del extracto acuoso al 20% para la determinación de taninos.



Fotografía N°10. Etapa B en la determinación de taninos, para luego ser leídos a 700nm.

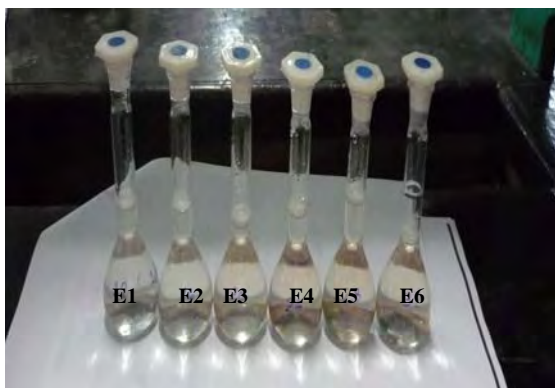


Fotografía N° 11. Extracción metanol-agua por reflujo del residuo desengrasado con n-hexano para la determinación y cuantificación de saponinas totales.

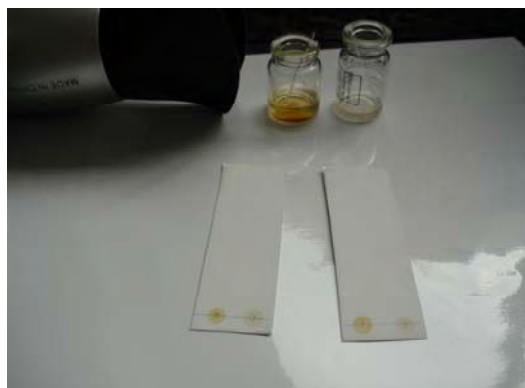


Fotografía N° 12. Concentración de la fracción butanólica en rotavapor para la determinación y cuantificación de saponinas totales.

ANEXO 6. Procedimiento en la cuantificación de saponinas totales y de análisis proximal en los residuos de la extracción del aceite de *Plukenetia volubilis* L.



Fotografía N° 13. Preparación del patrón se saponinas para la realización de la curva de calibración de saponinas totales.



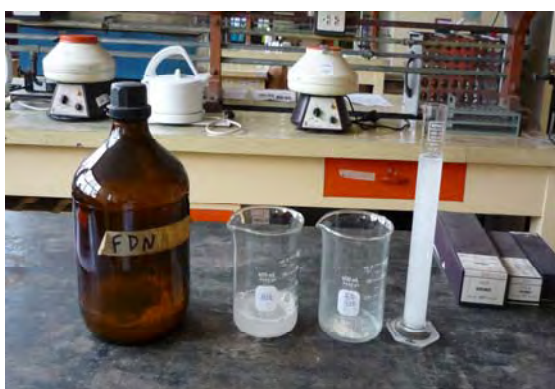
Fotografía N° 14. Sembrado del extracto alcohólico de *Saponaria quillaja* y de sacha inchi para la CCF



Fotografía N° 15. Determinación de humedad de la muestra de *Plukenetia volubilis* L. por el método gravimétrico.



Fotografía N° 16. Aparato extractor tipo Goldfisch de 6 unidades para la determinación de extracto etéreo de la muestra de *Plukenetia volubilis* L.



Fotografía N° 17. Determinación de fibra insoluble de la muestra de *Plukenetia volubilis* L. por el método de detergente neutro.



Fotografía N° 18. Filtración al vacío de la hidrólisis acida de la muestra de *Plukenetia volubilis* L. en la determinación de fibra cruda, por el método de hidrólisis acida y básica.

ANEXO 7. Ambiente del Laboratorio de Bioquímica y Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNMSM.



Fotografía N° 19. Digestión del hidrolizado ácido y básico de la muestra de *Plukenetia volubilis* L., para la determinación de fibra cruda



Fotografía N° 20. Reacción del catalizador y la muestra de *Plukenetia volubilis* L. en el tubo para digestión para la determinación de proteína por el método Kjeldahl.



Fotografía N° 21. Digestión de la materia orgánica de la muestra de *Plukenetia volubilis* L. en los tubos para digestión para la determinación de proteína por el método Kjeldahl.



Fotografía N° 22. Destilación de la muestra digerida de *Plukenetia volubilis* L. con hidróxido de sodio en el equipo Macrojeldahl SISTEMA TECATOR.



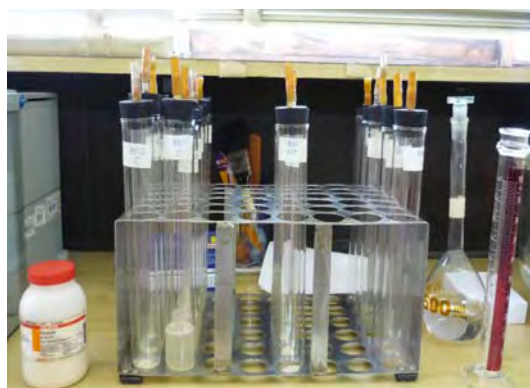
Fotografía N° 23. El destilado bajo la forma de borato de amonio con tres gotas del indicador de tashiro por triplicado.



Fotografía N° 24. Punto final de la titulación (violeta), con ácido sulfúrico para la determinación de proteína por el método de Kjeldhal.



Fotografía N°25. Peso de las muestras en tubos para digestión para la determinación de digestibilidad *in vitro* por el método enzimático por pepsina.



Fotografía N°26. Muestras por triplicado para la determinación de digestibilidad *in Vitro* por el método enzimático por pepsina y celulasa.



Fotografía N°27. Incubación en baño maría a 39°C de las muestras con la solución enzimática durante 24 horas, 48 horas, 72 horas para la determinación de digestibilidad *in Vitro* por el método enzimático por celulasa



Fotografía N° 28. Adición de HCl 6N para detener la digestión de la solución enzimática por celulasa, a la cual se le agregara 6mL de pepsina – buffer y se incubara a 39°C por 24 horas más.



Fotografía N° 29. Preparación del material, muestra y reactivos para la determinación de fósforo por el método espectrofotométrico con molibdovanadato



Fotografía N°30. Preparación del estándar de fósforo(KH_2PO_4)con solución molibdovanadato para la realización de la curva de calibración(E) y determinación de fósforo en muestra (M).

ANEXO 8. Ambiente del Laboratorio Centro de Investigación de Bioquímica y nutrición (CIBN) de la facultad de Medicina Humana de la UNMSM.



Fotografía N°31. Extracción de muestra deshidratada y desengrasada de sachá inchi con TRIS – HCL 50mM pH 6.5 para el fraccionamiento y purificación de proteínas por cromatografía en columna.



Fotografía N°32. Dialización de la fracción de proteína soluble (pico I) para la eliminación de la sal.



Fotografía N° 33. Muestra liofilizada de proteína soluble



Fotografía N°34. Trasvasado de una cantidad de muestra liofilizada en tubos eppendorff para el procedimiento de hidrólisis.



Fotografía N° 35. Hidrólisis de la proteína con HCL 6N en vacío con el equipo Reacti-Therm marca “PIERCE a una temperatura de 150°C por 2 horas.



Fotografía N°36. Secado al vacío del hidrolizado y derivatizado de la muestra de *Plukenetia volubilis* L. y estándar.



Fotografía N° 37. Hidrolizado de la muestra de *Plukenetia volubilis* L. al 20 y 30%.



Fotografía N°38. Estándar y muestra de *Plukenetia volubilis* L. al 20 y 30% desecada y derivatizada con buffer de acetonitrilo, piridina, agua y trietilamina con fenilisotiocianato



Fotografía N° 39. Filtración al vacío de los solventes y buffer de acetato de amonio previo a la determinación de aminoácidos por HPLC.



Fotografía N°40. Determinación de aminoácidos de la muestra *Plukenetia volubilis* L. y estándar por HPLC – Elite la Chrom.



Fotografía N°41. Análisis de toxicidad aguda a dosis única realizado en el bioterio de Farmacia y Bioquímica. Conformación de dos grupos tratados y dos controles de ambos sexos por grupo.



Fotografía N° 42. Administración del extracto acuosos de *Plukenetia volubilis* L por vía oral mediante cánula intragástrica a dosis única de 2000 mg/Kg de masa corporal